

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Prof. Dr. med., Dr. sc. h. c., Dr. med. vet. h. c., Dr. med. h. c.
H. Frhr. v. Kress

**Untersuchungen über die Anwendbarkeit
der Agargel-Elektrophorese im klinischen
Laboratorium zur Darstellung der Protein- und
Lipoproteidfraktionen bei Leberkranken**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1963

vorgelegt von
MANFRAS, HELGA, geb. THOMAS
aus Berlin

**Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend**

**Direktor: Prof. Dr. med., Dr. sc. h. c., Dr. med. vet. h. c., Dr. med. h. c.
H. Frhr. v. Kress**

**Untersuchungen über die Anwendbarkeit
der Agargel-Elektrophorese im klinischen
Laboratorium zur Darstellung der Protein- und
Lipoproteidfraktionen bei Leberkranken**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
MANFRAS, HELGA, geb. THOMAS
aus Berlin**

Dekan: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t
Referent: Professor Dr. med. Fritz A. P e z o l d
Korreferent: Professor Dr. med., Dr.rer.nat.
Ernst S c h ü t t e

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 13. 2. 1963

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einleitung: I. Prinzip der Elektrophorese	5
II. Formen der Elektrophorese	5
A. Methodik der Agargel-Elektrophorese	8
I. Einführung von Agar als Elektrophoresemedium	8
II. Beschreibung der Elektrophoresemethode in Agargel	8
a) Bereitung des Agargels	8
b) Herstellung der Agarplatten zur Elektrophorese	9
c) Auftragen des Serums auf die Agarplatten	10
d) Apparatur zur Elektrophorese	11
e) Fixation und Trocknung	13
f) Färbung	13
g) Auswertung bei der Agargel-Elektrophorese	14
B. Eigene Untersuchungen	15
I. Elektrophoreseuntersuchungen in Agargel mit Normalserum und reinen Proteinfractionen	15
a) Agargel-Elektrophorese mit einem Normalserum	15
b) Agargel-Elektrophorese mit reinen Proteinfractionen	16
c) Reproduzierbarkeit der Methode	21
d) Lipoproteid-Darstellung in Humanserum mittels der Agargeltechnik nach elektrophoretischer Trennung	22
II. Untersuchungen an Blutseren von Leberkranken	24
a) Agargel-Elektrophorese bei akuter Hepatitis	25
b) Agargel-Elektrophorese bei einem Ikterus gravis	27
c) Agargel-Elektrophorese beim Verschluß-ikterus	28
1. durch ein Pankreaskarzinom	28
2. durch ein Konkrement	30
d) Agargel-Elektrophorese nach Behebung des Gallengangverschlusses	32

	<u>Seite</u>
e) Agargel-Elektrophorese bei chronischer Hepatitis	33
f) Agargel-Elektrophorese bei Leberzirrhosen	35
1. bei kompensierter Leberzirrhose	35
2. bei dekompensierter Leberzirrhose	37
3. bei xanthomatöser biliärer Leberzirrhose	38
g) Agargel-Elektrophorese bei Coma hepaticum	40
C. Besprechung der Ergebnisse	42
I. Grenzen und Wert der Methode	42
II. Darstellung der Proteinfractionen und Lipidkomplexe	43
a) Darstellung der Proteinfractionen	43
b) Darstellung der Lipidkomplexe	44
D. Zusammenfassung	48
Literatur	50
Nachwort	54

E i n l e i t u n g

I. Prinzip der Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man einen Vorgang, bei dem sich elektrisch geladene Teilchen in einem Gleichstromfeld zu den Elektroden bewegen. Die Plasmaproteine sind normalerweise negativ geladen. Die Wanderungsrichtung der Proteinteilchen wird von der Wasserstoffionenkonzentration des sie umgebenden Milieus bestimmt. Pufferlösungen müssen genau definiert sein. Ihre Zusammensetzung muß so bewerkstelligt werden, daß sie ein möglichst konstantes pH für die ganze Dauer der Elektrophorese halten. Geeignet sind Mischungen von schwachen Säuren mit ihren Salzen, da sie Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration hemmen. In dem zur elektrophoretischen Trennung gewöhnlich gewählten alkalischen Medium sind fast alle Proteine negativ geladen, so daß sie zur Anode wandern. Im isoelektrischen Punkt werden die Ladungen der negativen Gruppen des Proteinteilchens durch die Ladungen seiner positiven aufgehoben. Das Proteinteilchen ist jetzt weder positiv noch negativ gegenüber dem Lösungsmittel geladen. Entspricht das pH der Lösung gerade dem isoelektrischen Punkt des betreffenden Eiweißes, so findet keine Wanderung der Proteinteilchen statt, da diese jetzt keinen Ladungsüberschuß tragen. Die isoelektrischen Punkte für Albumin betragen pH 4,6, für Alpha-Globulin 4,8, für Beta-Globulin 5,2, für Gamma-Globulin 6,4.

Die Auftrennung eines Proteingemisches erfolgt nach der Größe der erwähnten negativen Überschußladung, von der die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig ist. Demnach weisen die größte Wanderungstrecke pro Zeiteinheit die Albumine, die kleinste die Gamma-Globuline auf. Proteingemische verschiedener Molekulargewichte, aber gleicher elektrischer Ladung können elektrophoretisch nicht voneinander getrennt werden.

II. Formen der Elektrophorese

Als diagnostisches Hilfsmittel in Kliniken und für Untersuchungen zu Forschungszwecken hat die Elektrophorese weite Verbreitung gefunden. In der Hauptsache haben sich zwei Methoden entwickelt: Die freie Elektrophorese im Tiselius-Apparat und die Elektrophorese in stabilen Medien. Die Tiselius-Elektrophorese wird freie Elektrophorese deshalb genannt, weil die Proteinwanderung in einer freien Pufferlösung im U-Rohr erfolgt. Demgegenüber kann die elektrophoretische Wanderung auch in stabilen Medien, wie Papier, Stärke, Agar-Agar, Austauschharzen und dergleichen durchgeführt werden.

Vor- und Nachteile der freien Elektrophorese und der Papier-Elektrophorese.

Jede dieser beiden Methoden weist selbstverständlich Vorteile und Nachteile auf. Sie haben entweder in der Technik oder im Trennmedium ihre Ursache. Bei der freien Elektrophorese werden mit Hilfe geeigneter optischer Einrichtungen (Schlierenoptik) die verschiedenen Dichtegradienten der aufgetrennten Fraktionen bestimmt. Von Nachteil ist, daß man mit dieser Methode keine reinen Fraktionen, sondern Komponentensummen erhält. Ein weiterer, besonders praktisch wichtiger Nachteil der freien Elektrophorese liegt darin, daß eine wesentlich größere Menge Untersuchungsmaterial als zur Papier-Elektrophorese gebraucht wird.

Zwei große Vorzüge gegenüber der freien Elektrophorese haben der Papier-Elektrophorese zu einer weiten Verbreitung verholfen: Die Methode ist einfach auszuführen, und die als Untersuchungsmaterial erforderlichen Substanzmengen sind gering. Dieser an zweiter Stelle genannte Vorteil hat die elektrophoretische Bearbeitung auch von biologischem Material gesichert, das nur in geringen Mengen zur Verfügung steht oder niedrige Eiweißkonzentrationen aufweist, wie Tierseren, Liquor cerebrospinalis, Exsudate, Oedemflüssigkeiten, Kammerwasser, Pankreassaft. Neben den "klassischen" Proteinfraktionen lassen sich andere Komponenten durch Färbung (Lipide, Eiweißzucker) und radioaktive Markierung auffinden oder nach zonenweiser Extraktion aus dem Papier serologisch oder biochemisch weiterverarbeiten. Die Möglichkeit, nur eine Komponentenart wie zum Beispiel alle Proteine oder Lipide eines Serums durch entsprechende Färbung usw. sichtbar zu machen, gibt es bei der freien Elektrophorese nicht.

Die Papier-Elektrophorese weist aber auch erhebliche Nachteile auf, die ihre Anwendungsbreite einengen: Die meisten Proteine, besonders aber Proteide und Fermente, Punktionsflüssigkeiten und aufgearbeitete Organextrakte werden bei ihrer Wanderung bis zu einem gewissen Grad an die Papierfaser adsorbiert. Am einfachsten läßt sich diese Erscheinung demonstrieren, wenn man eine eiweißhaltige Lösung über ein Filterpapier laufen läßt, ohne den Strom einzuschalten, oder isolierte Reinfractionen im Vergleich zu einem kompletten Serum elektrophoretisch wandern läßt. Die anschließende Färbung deckt die Schwanzbildung (tailing factor) auf. Sie ist für die Albuminfraktion mit etwa 10 % Verlust an Substanz während der Wanderung beschrieben worden ¹⁵⁾. Genauer läßt sich die Adsorption an die Papierfaser dadurch demonstrieren, daß man nach Auftragen einer abgewogenen Menge eines einheitlichen Proteins am Ende der elektrophoretischen Wanderung die am Zielort angekommene zu der aufgetragenen Menge in Beziehung setzt. Besonders störend ist die Papieradsorption bei der elektrophoretischen Auftrennung der Lipo-

proteide im Humanserum, namentlich der Beta-Lipoproteide. Sehr ungünstig ist, daß die Adsorption verschieden groß ist, je nach Papiersorte, Pufferlösung, Temperatur und Zusammensetzung des zu untersuchenden biologischen Materials. Die Reproduzierbarkeit wird unter diesen Umständen ungenau. Die Inhomogenität des Papiers ¹⁵⁾, die ungleichmäßige Fortbewegung, die Schwierigkeiten bei der Messung der absoluten Beweglichkeit, die färberischen Ungenauigkeiten ¹⁸⁾ sollen als weitere Nachteile lediglich aufgezählt werden. Für quantitativ-experimentelle Untersuchungen mit biochemischer oder pathophysiologischer Fragestellung fallen diese Nachteile wegen der Fehlerquellen erheblich ins Gewicht. Für die klinische Routinediagnostik erscheinen sie dagegen tragbar.

Durch chemische Vorbehandlung des Papiers (Acetylierung, Ionenaustauscher) hat man die Schwanzbildung zu verkleinern versucht. Ersatz des Papiers durch synthetisches kapilläres Material ist ein anderer bereits beschrittener Weg zur Verbesserung.

Das Bestreben ist nun, eine Methode zu finden, die möglichst nur die Vorteile der beiden erwähnten Elektrophoresetechniken, nicht aber ihre Nachteile aufweist. Ein Versuch hierzu sind die Arbeiten mit Agargel als Trennmedium ²⁰⁾.

A. Methodik der Agargel-Elektrophorese

I. Einführung von Agar als Elektrophoresemedium

Nachweislich wurde Agargel als Medium zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen zuerst 1907 von FIELD, TEAGUE und BUXTON (4,5,24) angegeben. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß Agargel schon vor dieser Zeit zu solchen Arbeiten verwendet wurde. Die erste ausführliche Beschreibung einer gängigen Methode gab der Prager Arbeitskreis mit GORDON, KEIL, SEBESTA, KNESSL und ŠORM (1950⁶⁾). In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Arbeiten über Elektrophorese und Immunelektrophorese aus dem Pasteur-Institut von GRABAR und seinen Mitarbeitern veröffentlicht u.a. (8-14,25-32). 1955 berichtete SCHEIDEGGER (23) über eine Methode der Immunelektrophorese auf Objektträgern. WIEME (35) entwickelte eine Technik der Hochspannungselektrophorese, die es ermöglicht, auch kleinste Materialmengen und weiterhin Enzyme zu untersuchen. Mit dieser Ultramikromethode können kleine Gewebestücke direkt der Elektrophorese unterzogen werden.

II. Beschreibung der Elektrophoresemethode in Agargel

Der für die Agargel-Elektrophoresen dieser Arbeit angewendeten Technik liegen die Erfahrungen von GRABAR und seinen Mitarbeitern (11,12,14,25,26,36) zugrunde. Es waren zahlreiche Vorversuche erforderlich, um die Bedeutung exogener und endogener Faktoren beim Ablauf der Elektrophorese in Agargel festzustellen. Anfangs aufgetretene Mißerfolge hatten zum Beispiel ihre Ursache in Änderung der Gelkonzentration beim Herstellen und Reinigen des Gels, ungleicher Schichtdicke des Gels auf den Elektrophoreseplatten, zu hoher Raumtemperatur während der Elektrophorese.

a) Bereitung des Agargels

Agar-Agar in Fadenform (Riedel-de Haën AG, Seelze) brachte bei den Vorversuchen mit verschiedenen Agarsorten die besten Ergebnisse und wurde deshalb für alle Elektrophoresen dieser Arbeit verwendet.

Zunächst bereitet man ein 4%iges Gel. Dazu läßt man fein zerschnittenen Fädenagar 24 Stunden in der entsprechenden Menge Aqua bidest. quellen und anschließend im Wasserbad schmelzen. Obgleich in den Handel kommender Agar schon durch Filtrierung und Gefriertrocknung gereinigt ist, enthält der Fädenagar doch allerlei grobe und feine Verunreinigungen, z.B. eine wasserlösliche Substanz¹⁾, die verursacht, daß käuflicher Agar als 1%iges Gel mit Humanserum eine Fällungsreaktion gibt (Albumin und Globuline reagieren), so daß er vor Verwendung nochmals gereinigt werden muß. Das geschieht durch Waschen in Aqua dest. und Filtrieren. Das geschmolzene Agargel wird deshalb zum Erkalten in eine Emaille-

schale gegossen. 4%iges Agargel ist bei Zimmertemperatur so fest, daß es sich mühelos in Würfel schneiden läßt. Diese Würfel werden mindestens drei Tage in Aqua dest. gewaschen, welches zwei- bis dreimal am Tage erneuert werden muß. Durch das Waschen erzielt man eine wesentliche Entfärbung des anfangs gelblichen Gels und weitgehende Reinigung von der wasserlöslichen, die Fällungsreaktion verursachenden Substanz.

Zur anschließenden Reinigung des Agargels durch Filtrieren werden die gewaschenen Agargelwürfel, nachdem alles Waschwasser von ihnen abgetropft ist, wieder im Wasserbad geschmolzen. Da 4%iges geschmolzenes Agargel sich kaum filtrieren läßt, ist es erforderlich, das 4%ige Gel vor dem Filtrieren mit der für die Elektrophorese notwendigen Pufferlösung, die heiß sein muß, zu einem 2%igen Gel zu verdünnen. Außerdem wird unmittelbar vor dem Filtrieren die beim Schmelzen des Agargels verdampfte Flüssigkeitsmenge mit kochendem Aqua bidest. nachgefüllt. Filtriert wird durch hartes Filterpapier im Büchnerfilter mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe. Das Filtrat ist völlig farblos und klar. Es kann sofort für die Herstellung der Agarplatten zur Elektrophorese verwendet oder in gut verschlossenen Glaskolben bis zur Verwendung aufgehoben werden. Versuche mit verschiedenen Gelkonzentrationen zeigten, daß bei Konzentrationen über 2 % während der elektrophoretischen Auftrennung Risse in der Agargelschicht auftraten.

Als Pufferlösung diente für die Agargel-Elektrophoresen zu dieser Arbeit ausschließlich ein 0,05 mol Veronalpuffer, eingestellt auf einen pH -Wert von 8,2. Zur Herstellung der Pufferlösung werden 47,586 g Veronal-Natrium in 3 l Aqua dest. gelöst, 690 ml n/10 Salzsäure hinzugegeben. Nach Einstellen des pH -Wertes wird mit Aqua dest. zu 4,265 l aufgefüllt.

Während der Vorversuche wurden auch andere Pufferlösungen probeweise verwendet. Mit einem Natrium-Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,1, war eine Auftrennung in nur drei Fraktionen zu erreichen. Gute Ergebnisse dagegen konnten mit einem Monokalium-Dikalium-Phosphatpuffer, pH 7,7, erzielt werden. Dabei erfolgte eine Auftrennung in fünf Fraktionen; das α_1 -Globulin war deutlich vom Albuminkomplex getrennt, die α_2 -Fraktion lag anodenwärts, die Beta-Fraktion kathodenwärts dicht neben der Startstelle.

b) Herstellung der Agarplatten zur Elektrophorese

Bei der Elektrophorese in Agargel erhält man nur dann gut auswertbare Streifen, wenn das Agargel als Trennmedium eine völlig gleichmäßige Schichtdicke und einheitliche Gelkonzentration hat. Als Träger des Agargels während der Elektrophorese, der Fixation der gewanderten Komponenten, der Trocknung und des Färbens eignet sich am besten Glas, und zwar im Ziehverfahren hergestelltes. Dieses Glas sichert durch seine ebene Oberfläche eine gleichmäßige Schichtdicke. Weiterhin ist bei der Verwendung von Glasplatten

von Vorteil, daß Glas elektrischen Strom nicht leitet und von Puffer- und Farblösungen nicht angegriffen wird. Zu den Versuchen wurden 6,5 x 18 cm große Platten verwendet. Die gleichmäßige Dicke der Gelschicht auf den Glasplatten ist aber nicht nur von der ebenen Oberfläche des Glases abhängig; sie ist ebenso bedingt durch eine horizontale Unterlage für die Glasplatten bei der Herstellung der Agarplatten. Eine solche Unterlage erhält man am einfachsten, indem eine an festem Ort aufgestellte Fotoschale mit ca. 4%igem Agargel gleichmäßig ausgegossen wird.

Die Bereitung der Agargelplatten beginnt damit, daß die Glasplatten auf der Oberseite mit einem Tropfen geschmolzenen 4%igen Agargels gleichmäßig und dünn eingerieben und anschließend im Trockenschrank bei 100°C getrocknet werden. Der dünne Agarfilm, der dadurch auf den Glasplatten entsteht, bewirkt ein besseres Haften der Agargelschicht, die als Trennmedium dient, während der Elektrophorese und der sich anschließenden Prozesse. Die so vorbereiteten Platten werden auf die Agargrundlage in der Fotoschale gelegt. An den Schmalseiten der Glasplatten legt man nun in Pufferlösung getränkte Filterpapierstreifen, die so breit wie die Platten und ca. 5 cm lang sind, 1 cm weit auf und fixiert sie so lange mit kleinen Glasplatten, bis das heiße Agargel über die Platten gegossen ist. Die Filterpapierstreifen sollen später bei der Elektrophorese gelenkartige Verbindungen zwischen dem Elektrophoresemedium und der Elektrolýtlösung darstellen. Nach diesen Vorbereitungen wird bei Siedetemperatur im Wasserbad verflüssigtes 2%iges Agargel in der Menge über die Glasplatten gegossen, daß eine Schichtdicke von 3 mm entsteht. Nach dem Erkalten ist auch 2%iges Agargel so fest, daß es geschnitten werden kann. Die Platten mit den Filterpapiergelenken werden mit einem Skalpell umschnitten. An den Knickstellen der Gelenke wird die Agarschicht vorsichtig eingeschnitten. Mit einem besonderen Spatel, dessen unterer Abschnitt etwas abgewinkelt ist, greift man in der Mitte der Längsseite unter die Glasplatte, löst sie unter leichtem Aufwärtsdruck von der Agargrundlage, hebt sie heraus und legt sie auf eine lange, schmale Unterlage, so daß die mit Agargel bedeckten Filterpapierstreifen herunterhängen können. Die von Agargel freie Stelle, die nun an den Gelenken entstanden ist, muß mit 2%igem Agargel ausgefüllt werden, bis auch an dieser Stelle die Schichtdicke 3 mm beträgt. So wird verhindert, daß dem Filterpapier örtlich Feuchtigkeit durch Verdunstung entzogen wird und dadurch Konzentrationsänderungen in der Pufferlösung auftreten.

c) Auftragen des Serums auf die Agarplatten

Um die zu untersuchende Substanz in das Gel einbetten zu können, wird ein kleiner Behälter geschaffen, indem mit einem Stempel aus der Mitte der Elektrophoreseplatte ein schmales, an den Ecken abgerundetes Stückchen Agargel ausgestanzt wird. Für Untersuchungen an Serumproteinen genügt es, ein 3 x 15 mm großes Stück auszustanzen. Bei Untersuchungen der Serumlipide muß, entsprechend der größeren Auftragsmenge, ein Stück Agargel von der Größe

3 x 30 mm ausgestanzt werden. Die verwendeten Glasplatten sind für zwei nebeneinander liegende Auftragsstellen breit genug, so daß Doppelbestimmungen oder Paralleluntersuchungen möglich sind. Um die Einheitlichkeit des Elektrophoresemediums, die durch die Reservoirs für die Untersuchungssubstanz unterbrochen ist, wieder herzustellen, füllt man nicht nur die zu untersuchende Substanz ein, sondern ein Gemisch von Serum, Aqua bidest. oder Pufferlösung und 4%igem Agargel. Das Verhältnis von Serum, Aqua bidest. bzw. Pufferlösung und 4%igem Agargel im Gemisch ist 2 : 3 : 5. Die Auftragsmenge von dem Gemisch beträgt für Auftrennungen der Serumproteine 0,1 ml - das entspricht 0,02 ml Serum -, für die der Serumlipide 0,3 ml. Das Gemisch wird am besten in Reagenzgläsern, die auf 45 - 50°C erwärmt sind, bereitet. Auch die Pufferlösung, bzw. das Aqua bidest. müssen vor dem Mischen auf die gleiche Temperatur erwärmt und das geschmolzene 4%ige Agargel auf 50°C abgekühlt werden, um die Denaturierung der Serumproteine zu verhindern. Ob zu dem Gemisch Pufferlösung oder Aqua bidest. gegeben wird, ist, wie Paralleluntersuchungen ergeben haben, für die elektrophoretische Auftrennung ohne Bedeutung. Die Auftragsstellen werden zuletzt mit einem Tropfen 2%igen Agargels zugedeckt.

d) Apparatur zur Elektrophorese

Zur Elektrophorese werden die Platten derart nebeneinander über zwei lange, parallel zueinander stehende, mit Pufferlösung gefüllte Wannen gelegt, daß ein Filterpapierfüßchen jeder Platte in die eine, das zweite in die andere Wanne taucht. Als Elektroden dienen Platindrähte von der Länge der Pufferwannen, die mit einem Spannungsstabilisator verbunden sind. Diese Platindrahtelektroden sind in Plexiglasrinnen befestigt und werden mit Haken ans dem gleichen Material an der äußeren Wand der Wannen aufgehängt. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, in die Wannen zwischen Elektrode und Filterpapierfüßchen eine nicht ganz bis zum Wannengrund reichende Trennwand zu setzen. Sie verhindert, daß Gasblasen, die während der Elektrophorese an den Elektroden entstehen, sich an das Filterpapier setzen. Um pH-Änderungen der Elektrolytlösung in den Wannen während der Elektrophorese zu vermeiden, läßt man aus einem Zulaufgefäß an der einen Schmalseite der Pufferwannen ständig frische Pufferlösung nachtropfen. Auf der anderen Seite der Wannen verhindert ein Abfluß das Überlaufen der Pufferlösung und sichert eine gleichbleibende Höhe des Flüssigkeitsspiegels. Der Zulauf wird so reguliert, daß ein Pufferdurchlauf von ca. 1,5 l/Stunde entsteht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstanter Klemmenspannung und einer Spannung von 4,5 V/cm im Trennmedium. Sie dauert 7 Stunden. Da sich die Agarplatten während der Elektrophorese nicht wie die Streifen bei der Papierelektrophorese in geschlossenen Kästen befinden, ist es erforderlich, die Apparatur in einem thermo- und feuchtigkeitskonstanten Raum aufzustellen. Eine Raumtemperatur von höchstens 20°C und ein hoher Feuchtigkeitsgehalt der Luft verhindern weit-

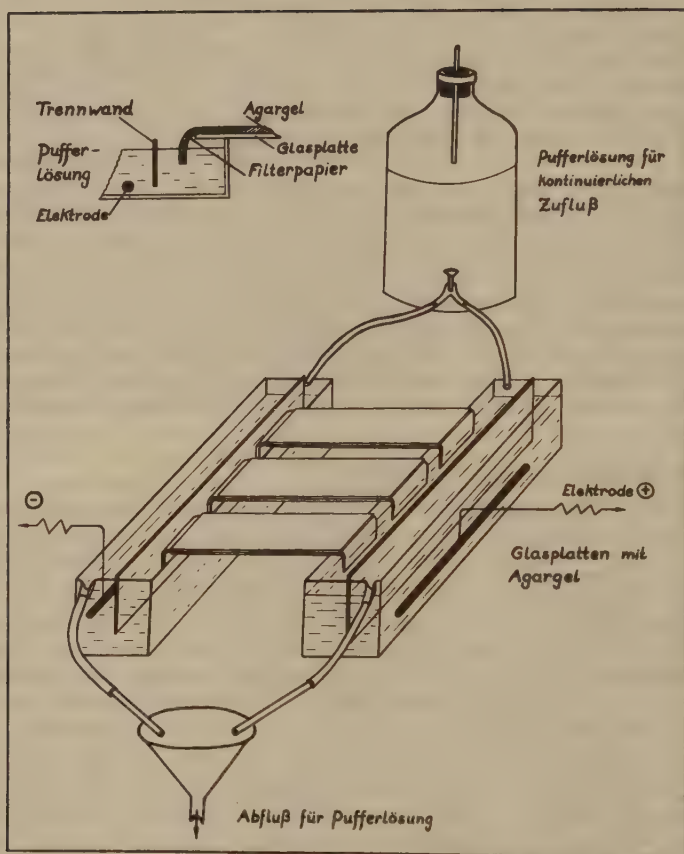


Abb. 1: Apparatur zur Agar-Elektrophorese

gehend das Verdunsten von Flüssigkeit aus dem Agargel und somit eingreifende Veränderungen der Ionenkonzentration der Elektrolytlösung im Agargel und in den Pufferwannen. Ist die Raumtemperatur zu hoch und der Feuchtigkeitsgehalt der Luft sehr niedrig, schrumpft und reißt schließlich das Agargel.

e) Fixation und Trocknung

Nach beendeter Elektrophorese müssen die gewanderten Komponenten sofort im Trennmedium fixiert werden, damit die Diffusion verhindert wird. In Anlehnung an die Arbeitsvorschriften von GRABAR ²⁶⁾ legt man deshalb die Platten, nachdem die Filterpapiergelenke abgeschnitten worden sind, 6-8 Stunden in 2%ige Essigsäurelösung. Anschließend erfolgt die Trocknung in einem Thermostaten bei 37°C. Damit die Platten gleichmäßig trocknen und gleichzeitig die Salze aus dem Agargel eluiert werden, bedeckt man sie für die Zeit des Trocknens mit feuchten Filterpapierstreifen. Zum Anfeuchten der Streifen dient die gleiche Pufferlösung wie zur Bereitung des Agargels und zur Elektrophorese. Nach zwei bis drei Tagen sind die Platten völlig trocken. Die während der Elektrophorese 3 mm dicke Agargelschicht ist zu einem dünnen Film geworden. Das Filterpapier löst sich, wenn die Platten vollkommen trocken sind, meist von selbst ab. Möglicherweise auf dem Agarfilm haftende Papierfasern lassen sich leicht durch schnelles Abwaschen mit Wasser entfernen. Der Beweis, daß die Fixation vollkommen ist, läßt sich bringen, indem man die Filterpapierstreifen, welche die Platten während des Trocknens bedecken, wie Papier-Elektrophoresestreifen anfärbt ²⁵⁾. Wiederholte derartige Kontrollen ergaben nie eine Spur von angefärbten Bestandteilen. Diese Tatsache spricht für die vollständige Fixation im Agargel.

f) Färbung

Nach der Trocknung werden die Elektrophoresestreifen gefärbt. Es ist jedoch möglich, die getrockneten Platten an einem trockenen Ort bis zur Färbung längere Zeit aufzubewahren. Der Färbetechnik liegen die Angaben von URIEL und GRABAR ²⁶⁾ zugrunde. Als Farbstoffe zur Darstellung der Proteinfractionen im Agarfilm eignen sich Amidoschwarz und Bromphenolblau. Die beste Darstellung gelingt mit Amidoschwarz. Da die Platten in die Farblösung hineingelegt werden, kann der Farbstoff überall gleichmäßig einwirken. Nach einer Bromphenolblau-Färbung müssen die Elektrophoresestreifen noch über Ammoniak gebläut werden. In den Agarfilm dringt das Gas aber nur sehr schwer ein, viel schwerer als zwischen die Fasern der Papier-Elektrophoresestreifen. Ob das Gas überall auf den Film gleichmäßig einwirkt und wann der Vorgang des Bläuens beendet ist, läßt sich nicht sicher feststellen. Außerdem wird der Agarfilm nach der Behandlung mit Ammoniak spröde und bricht leicht.

Zur Herstellung der Amidoschwarz-Farblösung wird 1 g Amidoschwarz in 900 ml Acetatpuffer und 100 g Glycerin gelöst. Der Acetatpuffer besteht aus gleichen Teilen einer 6%igen Essigsäurelösung und einer 1,36%igen Natriumacetatlösung. Zur Färbung legt man die Platten für die Dauer von 5 Stunden waagerecht mit der Filmseite nach oben in die Amidoschwarzlösung. Um nach beendeter Färbung die überschüssige Farbe von den Platten zu entfernen, ist es notwendig, die Platten in zwei aufeinanderfolgenden Essigsäure-

Glycerinbädern von je einer Stunde zu spülen. Die Essigsäure-Glycerinlösung besteht aus 150 ml Glycerin, 20 ml Eisessig und 830 ml Aqua dest. Die gespülten Platten werden im Thermostaten bei 37°C getrocknet.

Für die Anfärbung der Lipide stehen die Farbstoffe Sudanschwarz, Oelrot 0, Scharlach R Geigy und Sudan IV zur Verfügung²⁶⁾. Zur Darstellung von Lipidkomplexen in dieser Arbeit wurde vorwiegend Oelrot 0-Lösung verwendet, nachdem vergleichende Voruntersuchungen mit Sudanschwarz und Oelrot 0 ergeben hatten, daß mit Oelrot 0 eine klarere Darstellung gelingt. Zur Bereitung der Oelrotlösung werden 0,4 g Oelrot 0 mit 1 l 60%igen Alkohols im Rücklaufkühler bis zum Sieden erhitzt, nach dem Abkühlen mindestens zwölf Stunden mit dem Magnetrührer bei 37°C gerührt und bei gleicher Temperatur durch hartes Filterpapier filtriert. Die Dauer der Oelrot-Färbung beträgt 4 Stunden. Sie erfolgt bei 37°C im Thermostaten in luftdicht verschlossenen Schalen. Mit Oelrot angefärbte Platten wäscht man zum Entfernen der überschüssigen Farbe eine Stunde in 15%iger Glycerinlösung und trocknet sie anschließend wieder im Thermostaten.

Sudanschwarzlösung zur Färbung der Lipide wird aus 1,2 g Sudanschwarz, 20 ml Natronlauge, 380 ml Aqua dest. und 600 ml absolutem Alkohol bereitet. Nach dem Mischen der vier Bestandteile erhitzt man die Lösung bis zum Sieden und filtriert sie nach dem Abkühlen. Sudanschwarzlösung muß im Dunkeln aufbewahrt werden, weil sie vom Licht zersetzt wird. Zur Darstellung der Lipidkomplexe durch Sudanschwarz färbt man zunächst 2 Stunden bei Zimmertemperatur in luftdicht verschlossener Schale, anschließend zweimal je 15 Minuten in 50°C warmer Farblösung. Um überschüssige Farbe zu entfernen, werden die Platten bis zu 5 Stunden in 15%iger Glycerinlösung gewaschen. Sudanschwarzlösung kann zur Färbung nur einmal, dagegen Oelrot 0-Lösung mehrmals verwendet werden.

Durch die Einwirkung des im Waschbad enthaltenen Glycerins gelingt es nun leicht, den Agarfilm nach der zweiten Trocknung von der Glasplatte abzuziehen. Der Agarfilm ist dort, wo er keine gewanderten und angefärbten Substanzen enthält, völlig durchsichtig. Er reagiert auf Änderungen von Luftfeuchtigkeit und Temperatur wie Cellophanpapier und wird aus diesem Grunde am besten bei konstanter Temperatur zwischen Filterpapier aufbewahrt.

g) Auswertung bei der Agargel-Elektrophorese

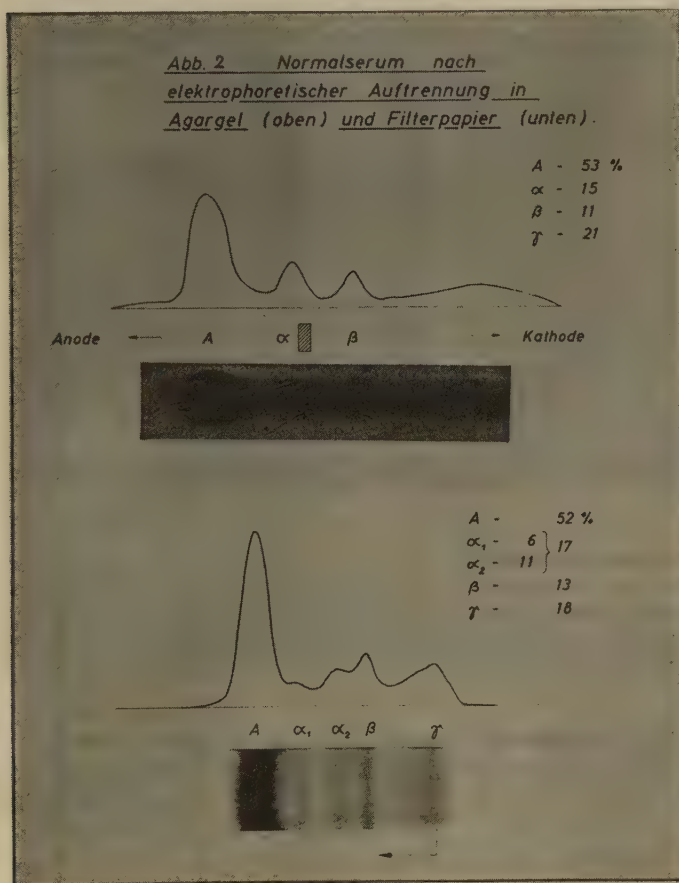
Die prozentuale Verteilung der getrennten Substanzen im Agarfilm läßt sich leicht mit Hilfe der Transparenzphotometrie bestimmen. Von Vorteil ist dabei, daß der Agarfilm völlig transparent ist und zur direkten Photometrie nicht erst mit einer Transparenzlösung vorbehandelt werden muß wie ein Papier-Elektrophoresestreifen.

B. Eigene Untersuchungen

I. Elektrophoreseuntersuchungen in Agargel mit Normalserum und reinen Proteinfractionen

a) Agargel-Elektrophorese mit einem Normalserum Auftrennung in vier Fraktionen

Normalserum zeigt nach elektrophoretischer Auftrennung in Agargel nach dieser Technik mindestens vier deutlich voneinander getrennte Fraktionen; davon wandern zwei kathodenwärts, eine wandert zur Anode, eine entfernt sich kaum von der Startstelle.



Bei den meisten Seren erreicht man eine Auftrennung in fünf Fraktionen. Die fünfte Fraktion wandert wie die größte Fraktion des Normalserums, hinter der sie nur wenig zurückbleibt, anodenwärts. Es sei dies an einem α_1 -globulinreichen pathologischen Serum gezeigt (Abb. 3).

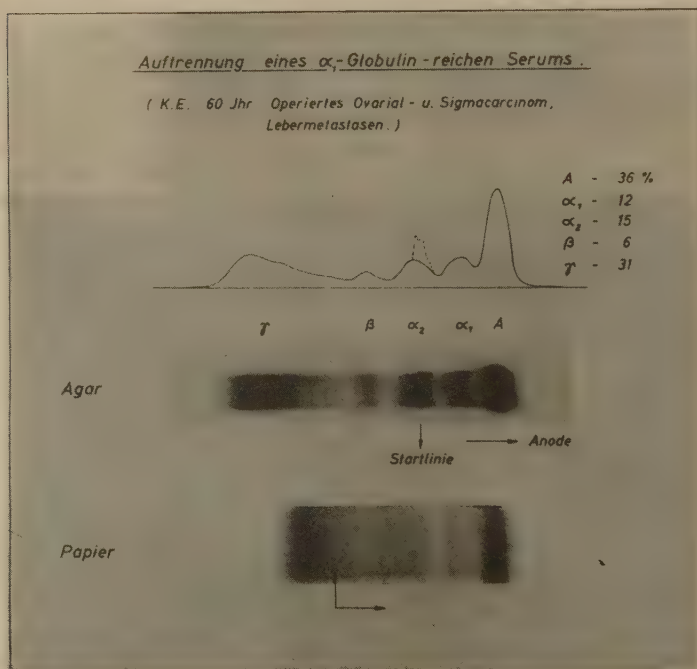


Abb. 3: Auftrennung eines α_1 -globulinreichen Serums.

Bei manchen Seren erscheint vor der anodisch wandernden größten Fraktion eine kleine, meist färberisch nur gerade angedeutete Fraktion. Diese wurde bereits von URIEL und SCHEIDEGGER beschrieben²⁵⁾.

b) Agargel-Elektrophorese mit reinen Proteinfractionen

Mit der Darstellung von vier Fraktionen aus Normalserum ist aber noch nicht ohne weiteres erwiesen, daß es sich dabei um die von der

Elektrophorese im Tiselius'schen U-Rohr und der Papier-Elektrophorese bekannten vier Hauptfraktionen handelt, nämlich (in der Reihenfolge von der Anode zur Kathode) Albumin, Alpha-, Beta- und Gamma-Globulin.

Durch Elektrophorese chemisch reiner Proteinfractionen läßt sich unter standardisierten Bedingungen gut zeigen, wohin die Fraktionen in den verschiedenen Medien wandern. Es wurden daher Paralleluntersuchungen mit reinen Proteinfractionen und einem Normalserum auf Filterpapier und in Agargel durchgeführt.

Als chemisch reine Fraktionen dienten: Humanalbumin "reinst", Human-Alpha₂-Glykoprotein, Beta₁-metallbindendes Globulin und Human-Gamma-Globulin ^{x)}. Aus Humanalbumin "reinst" in Trockenform wurde, entsprechend der normalen Albuminkonzentration im Serum, eine 4,5%ige Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die Bereitung der entsprechenden Globulinlösungen erfolgte nach den relativen Konzentrationen im Normalserum nach Ermittlung des Durchschnittswertes aus 20 Normalseren. Von diesen Stammlösungen wurden zur Elektrophorese stets die gleichen Volumina aufgetragen. Zur Elektrophorese wurde das Filtrierpapier der Fa. Macherey & Nagel Nr. 214 verwendet, das in seiner Textur etwa dem Whatman 3MM, bzw. dem schwedischen Munktell-Papier Nr. 20/150 entspricht. Die Elektrophorese wurde am hängenden Streifen durchgeführt, und zwar mit allen Streifen gleichzeitig in demselben Untersuchungsgang. Als Puffer diente Barbitalpuffer mit einem p_H 8,6 und einer Ionenstärke von 0,05.

Die Elektrophoreseuntersuchungen der reinen Proteinfractionen und des Normalserums in Filterpapier zeigen (Abb. 4), daß es sich bei den verwendeten Reinfractionen um die einzelnen Proteinfractionen des Humanserums handelt. Bezüglich der Lokalisation stimmen sie mit den entsprechenden Fraktionen des vollständigen Normalserums überein. Geringere Abweichungen sind aus elektrophoretischen Untersuchungen bekannt und dadurch zu erklären, daß Reinfractionen manchmal etwas schneller wandern als die entsprechenden Fraktionen des vollständigen Serums ⁷⁾.

Wenn man die elektrophoretisch einheitlichen Fraktionen in größeren Konzentrationen aufträgt, so fällt die Schwanzbildung besonders beim Albumin und dem Alpha₂-Globulin deutlich ins Auge. Sie ist der Ausdruck für die Eiweißadsorption an das Filterpapier und bei der Beurteilung der Papierelektrophorese natürlich in Rechnung zu setzen.

^{x)} Für die Überlassung der reinen Proteinfractionen sind wir Herrn Prof. SCHULTZE, Behring-Werke, Marburg/Lahn sehr zu Dank verpflichtet.

Abb. 4 Papierelektrophorese chemisch reiner
Humanproteinfraktionen im Vergleich zu einem
Normalserum.

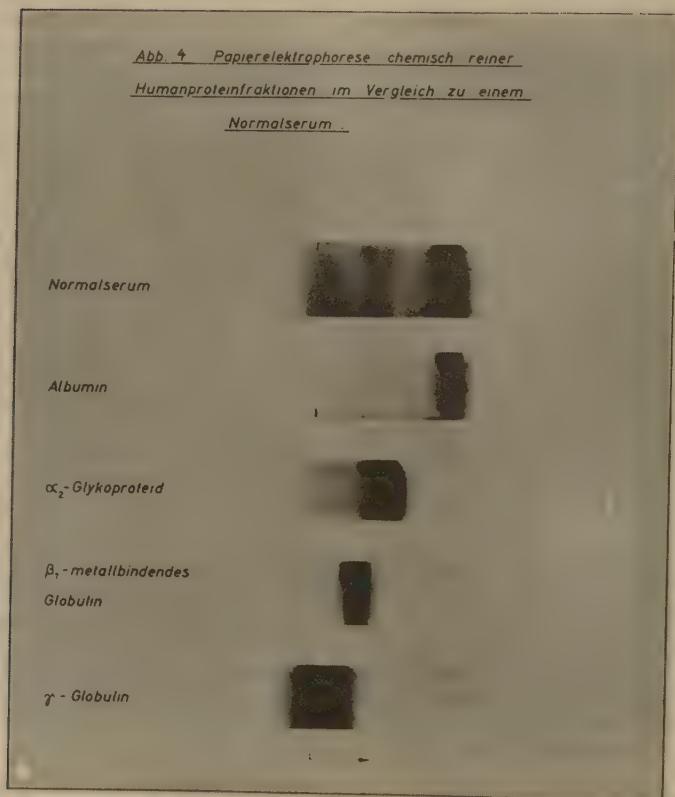
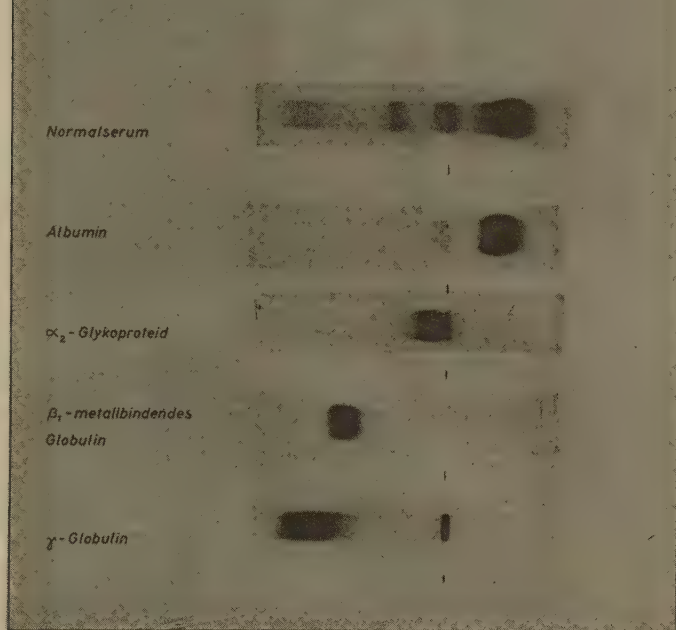


Abb. 5 Vergleichende elektrophoretische
Auftrennung von chemisch reinen Proteinfractionen
mit einem Normalserum in Agar-Gel.



Die vergleichenden Elektrophorese-Untersuchungen mit reinen Proteinfractionen und einem Normalserum in Agargel (Abb. 5) ergeben grundsätzlich die gleichen Verhältnisse wie im Filterpapier.

Die einzelnen Fractionen finden sich an der gleichen Stelle wie die entsprechenden im Normalserum. Sie sind also hinsichtlich der Wanderungsrichtung und des erreichten Standortes identisch. Allerdings ist bemerkenswert, daß die reine Beta-Globulinfraktion weiter kathodisch gewandert ist als die im vollständigen Serum. Sie liegt etwa in der Mitte zwischen der Beta- und der Gamma-Globulinfraktion des Normalserums. Die schnellere Wanderung der Reinfraction erscheint nach den Befunden von GORDON ⁷⁾ verständ-

lich, hätte danach also in den Milieuveränderungen und der geänderten Oberflächenaktivität des aus dem Serumverband herausgenommenen Beta-Globulinmoleküls die Ursache.

Bei Verwendung von Agargel als Trennmedium und dem angegebenen Veronalpuffer muß man neben dem elektrophoretischen Effekt der Elektroendosmose Rechnung tragen. Unter ihrer Wirkung erfolgt ein Materialtransport entgegen der elektrischen Stromrichtung. Vom praktischen Standpunkt aus erscheint dieser Vorgang nicht nachteilig, da er eine besonders gute Trennung der Komponenten im Agar begünstigt.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen erscheint es berechtigt, die im Agarmilieu dargestellten vier Fraktionen als Albumin, Alpha-, Beta- und Gamma-Globulinfraktion zu bezeichnen. Unter den genannten Bedingungen wandern die Albumine und das Alpha₁-Globulin (vergl. Abb. 5) anodenwärts, und zwar das Albumin am weitesten. Beta- und Gamma-Globulin wandern zur Kathode, wobei die Laufstrecke des Gamma-Globulins größer ist. Das Alpha₂-Globulin entfernt sich kaum von der Startstelle. Die Albumine bilden im Agargel einen runden Komplex, während die Alpha-Globuline und das Beta-Globulin fast rechteckig zur Darstellung kommen. Die Gamma-Globulinfraktion ist die längste aller Fraktionen. Kathodenwärts ist sie schärfer begrenzt als auf der Seite zur Startstelle. Zwischen den einzelnen Fraktionen bleibt der Agarfilm nach der Färbung mit Amidoschwarz-Lösung völlig klar. Diese Zwischenräume sind also proteinfrei. Die scheinbare Schwanzbildung hinter der Albuminfraktion ist durch die unter den gegebenen Bedingungen manchmal noch ungenügende Abtrennung der Alpha₁-Globulinfraktion hervorgerufen.

Vergleicht man die prozentuale Verteilung der Serumproteine in den verschiedenen Medien, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 1: Prozentuale Proteinverteilung des in Abb. 2 dargestellten Normalserums (errechnet aus dem Farbstoffgehalt)

Trägersubstanz	Albumin	Alpha	Beta	Gamma
Agargel	53	15	11	21
Filterpapier	52	$\frac{17}{\alpha_1^6 \alpha_2^{11}}$	13	18

c) Reproduzierbarkeit der Methode

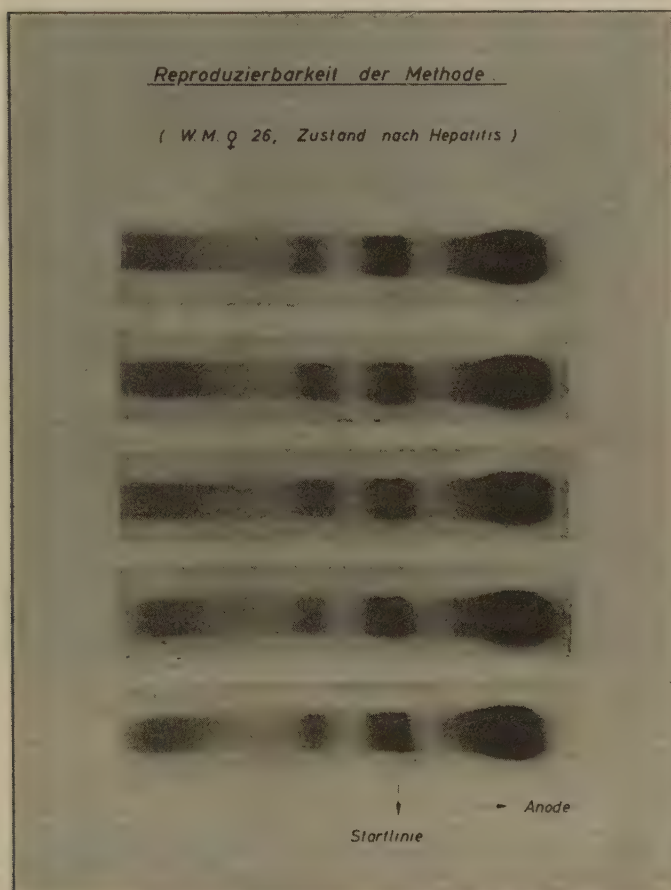


Abb. 6: Reproduzierbarkeit der Methode.

Bei genauer Einhaltung der angegebenen standardisierten Technik sind die Resultate gut reproduzierbar, was die Abb. 6 darstellen möge. Die methodischen Abweichungen liegen bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschriften in tragbaren Grenzen.

Für die später folgenden Untersuchungen an Blutseren von Leberkranken ist es wichtig, außer dem Protein-Elektrophoresebild auch die Verhältnisse bei der Lipoproteid-Elektrophorese in Agargel zu kennen. GRABAR und Mitarbeiter ²⁵⁾ haben schon darauf hingewiesen, daß die relative Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteide bei der Elektrophorese in Agargel anders ist als bei der freien Elektrophorese im Tiselius'schen U-Rohr, also auch anders als bei der Papierelektrophorese. Da die Ergebnisse bei der Protein-Elektrophorese in Filterpapier und in Agargel übereinstimmen, nicht aber die bei der Lipoproteid-Elektrophorese, muß man annehmen, daß in Agargel andere Bindungsverhältnisse für die Lipoproteide herrschen als in anderen Medien ¹⁹⁾.

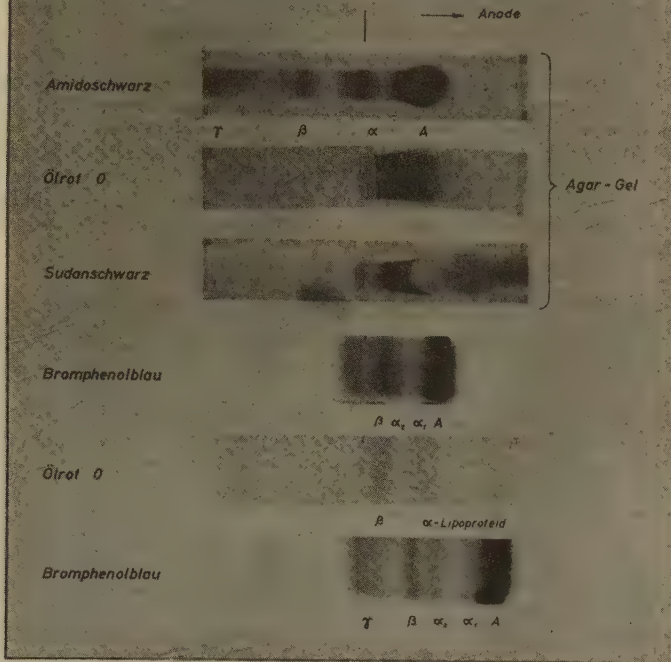
d) Lipoproteid-Darstellung in Humanseren mittels der Agargeltechnik nach elektrophoretischer Trennung

Will man Bindungsverhältnisse mit Elektrophoresemethoden untersuchen, ist es erforderlich, daß die in Frage kommenden Substanzen unter gleichen Bedingungen (gleiches Material, gleiche Apparatur, gleiche Stromverhältnisse, gleiche Pufferlösungen, gleiche Färbemethoden usw.) untersucht werden. Diese Voraussetzung ist in allen folgenden Versuchen erfüllt worden. Es wurden bei der Methode in Agargel gleichzeitig je zwei Paralleluntersuchungen mit dem gleichen Serum in der gleichen Apparatur durchgeführt. Ein Doppelstreifen jedes Serums wurde mit Amidoschwarz-Farblösung, der zweite Doppelstreifen mit Oelrot 0-Lösung gefärbt. Bei der Elektrophoresemethode auf Filterpapier wurden die Filterpapierstreifen nach beendigter Elektrophorese und Trocknung der Länge nach genau in der Mitte durchgeschnitten und auf der einen Hälfte die Proteine, auf der anderen die Lipide mit den entsprechenden Farbstoffen angefärbt. Es ergeben sich dabei für Normalserum charakteristische Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Sie betreffen, wie aus der Abb. 7 hervorgeht, den Standort der Lipoproteide. ²¹⁾

Die Streifen I, IV und VI (von oben gezählt) zeigen die Verhältnisse nach Färbung mit Proteinfarbstoffen, die Streifen II, III und V nach Fettfärbung. Der Unterschied zwischen IV und VI ist lediglich durch die Dauer der elektrophoretischen Trennzeit ("Laufzeit") gegeben, die bei Streifen VI sechs Stunden beträgt, bei Streifen IV wie bei Streifen V zweieinhalb Stunden.

Die fettgefärbten Agargelstreifen (II mit Oelrot 0, III mit Sudanschwarz) ergeben beim Gesunden drei Fraktionen: Die am stärksten angefärbte Fraktion liegt im Bereich der Alpha-Globulinfraktion, bzw. etwas anodenwärts von dieser. Im Bereich des

Abb. 7 Normalserum nach elektrophoretischer
Auftrennung in Agar-Gel und auf Filterpapier.



Albumins findet sich eine schwächer gefärbte Fraktion. Eindeutig dieser vorauswandernd liegt die schon von GRABAR und Mitarbeitern abgebildete Schnellfraktion (fraction rapide) 9). Der Unterschied in der Wanderungstrecke zwischen den Streifen II und III ist durch die verschiedene Laufzeit bedingt. Die fraction rapide kommt, wie die Abbildung zeigt, unter den gegebenen Bedingungen erst deutlich bei einer Laufzeit von acht Stunden zur Darstellung.

Im Agargel sind die Lipoproteinfraktionen meist nicht scharf voneinander abgetrennt wie im Filterpapier. Trotzdem lassen sie sich deutlich voneinander abgrenzen. Wie der Streifen V zeigt, liegt die größere Beta-Lipoproteinfraktion auf dem Filterpapier im Bereich der Beta-Globuline und die Alpha-Lipoproteinfraktion etwa im Bereich der Alpha₁-Globuline. Sie reicht allerdings auch noch etwas in den Albuminbereich hinein.

Unter den gegebenen Bedingungen der gleichzeitigen elektrophoretischen Auftrennung auf dem gleichen Filterpapierstreifen ergibt sich die Berechtigung, bei der Papierelektrophorese die beiden hauptsächlichen Lipoproteinfraktionen nach ihrer Lokalisation im Vergleich mit dem eiweißgefärbten Parallelstreifen zu benennen. Das Alpha-Lipoprotein wandert mit der gleichen Geschwindigkeit wie das Alpha₁-Globulin, das Beta-Lipoprotein mit der des Beta-Globulins.

Wenn das Beta-Lipoprotein tatsächlich eine feste Bindung an die Beta-Globulinfraktion und das Alpha-Lipoprotein an die Alpha₁-Globulinfraktion hat, so müßte zu erwarten sein, daß dies unter den Bedingungen der Agarelektrophorese ebenfalls zum Ausdruck kommt.

Die Gegenüberstellung zwischen Agarelektrophorese und Papierelektrophorese ergibt eindeutig, daß sich bei der Agarelektrophorese keine Fettfärbung im Bereich des Beta-Globulins findet. Wie an pathologischen Fällen weiter gezeigt wird, lassen sich fettgefärbte Fraktionen überhaupt nur im Bereich der Alpha-Globulinfraktion und Albuminzone, sowie im Bereich der Rapidfraktion nachweisen. Nur gelegentlich findet sich auch im Bereich der Startlinie eine fettgefärbte Zone.

Versuche mit der Alpha- und der Beta-Lipoproteinfraktion, die in der Ultrazentrifuge voneinander getrennt wurden, haben gezeigt, daß das Beta-Lipoprotein im Filterpapier der Fraktion im Agargel entspricht, die zwischen der Startstelle und dem Albumin liegt. Nach der Elektrophorese der Alpha-Lipoproteinfraktion in Agargel ließ sich durch die Färbung eine Fraktion anodenwärts vom Albumin darstellen, also die Rapidfraktion¹⁹⁾. Die Tatsache läßt sich später auch beim Vergleichen lipidgefärbter Elektrophoresestreifen von pathologischen Seren nachprüfen.

II. Untersuchungen an Blutseren von Leberkranken

Bei Untersuchungen an pathologischen Seren lassen sich durch elektrophoretische Auftrennung im Agargelmedium für manche Krankheitsbilder charakteristische Veränderungen im Vergleich zum Bild der Elektrophorese im gleichen Medium beim Gesunden deutlich erkennen. Hier soll gezeigt werden, wie die Veränderungen bei Erkrankungen oder Miterkrankungen der Leber aussehen.

a) Agargel-Elektrophorese bei akuter Hepatitis

Im ersten Fall handelt es sich um eine akute Hepatitis, die bei der 41jährigen Patientin R.I. plötzlich mit den bekannten Erscheinungen, wie Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Mattigkeit und Gliederschmerzen auftrat und nach vierzehn Tagen einen an den Skleren erkennbaren Ikterus, Entfärbung des Stuhls und Dunkelwerden des Urins verursachte. Papier- und Agarelektrophorese zeigen bei der Proteinfärbung übereinstimmend eine Auftrennung in vier Fraktionen (Abb. 8).

Auf beiden Streifen fällt im Vergleich zum Normalserum eine stärkere Anfärbung im Bereich der Beta- und der Gamma-Globuline auf.

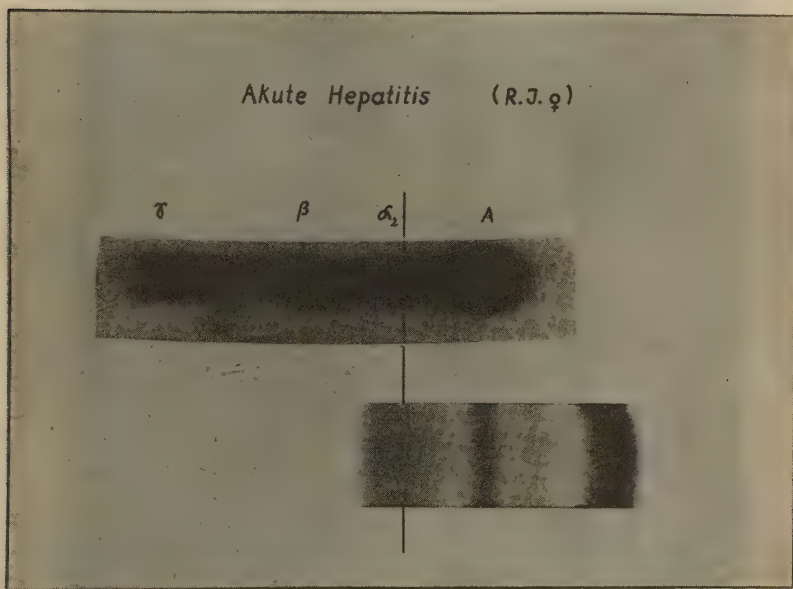


Abb. 8: Elektrophoretische Auftrennung eines Serums von einer Kranken mit akuter Hepatitis.
Oben: Agargel unten: Filterpapier

Lipoproteid-Elektrophorese in Filterpapier weist in diesem Fall, wie Abb. 9 zeigt, auch bei wiederholten Untersuchungen drei Fraktionen auf: Eine im Bereich der Beta-Globuline, eine im Bereich der Alpha-Globuline und die dritte etwas anodenwärts vom Albumin. Nach Auftrennung in Agargel lassen sich nur zwei Fraktionen durch die Fettfärbung darstellen. Die beiden Fraktionen sind deutlich voneinander getrennt. Die größere, d.h. die stärker angefärbte Fraktion reicht von der Startstelle bis zur Mitte des Albuminkomplexes. Die zweite, schwächer angefärbte Fraktion ist die sogenannte Rapidfraktion. Sie liegt - in diesem Fall besonders weit - anodenwärts vom Albumin.

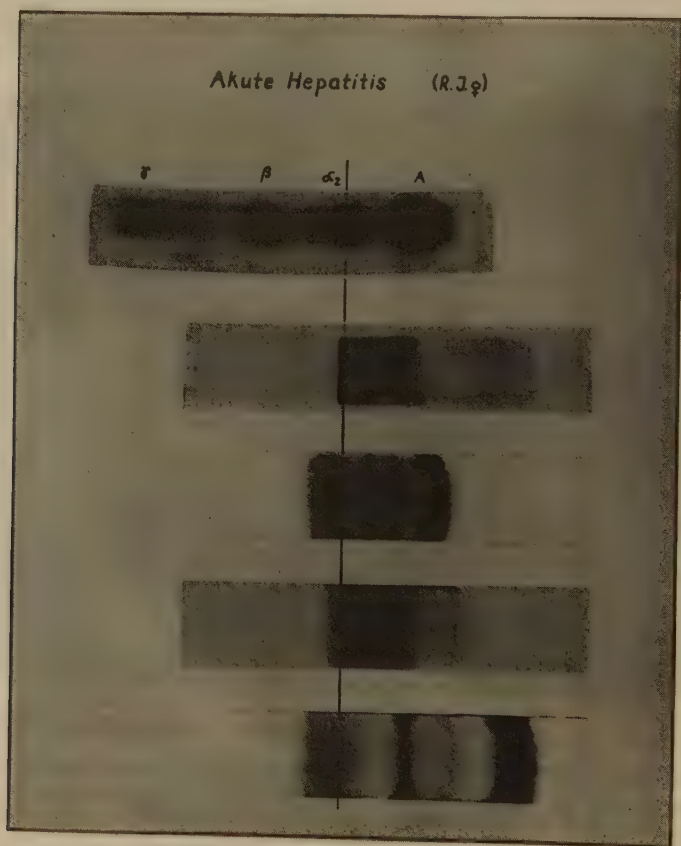


Abb. 9: Elektrophorese eines Serums bei akuter Hepatitis. Gegenüberstellung der Lipoproteidfraktionen zu den Proteinfractionen. Oben: Agargel-, unten: Filterpapierstreifen.

b) Agargel-Elektrophorese bei einem Ikterus gravis

Bei den akuten Hepatitiden ist die Rapidfraktion stets vorhanden. Jedoch gibt es Krankheitsbilder, bzw. Krankheitsstadien, unter denen die Rapidfraktion verschwindet. Die Abb. 10 zeigt ein Beispiel dafür.

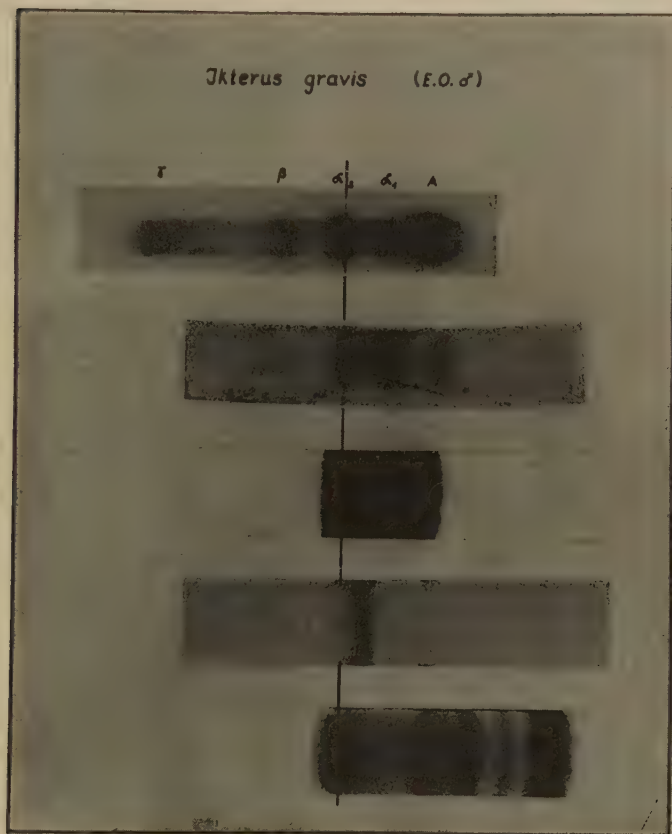


Abb. 10: Elektrophoretische Auftrennung eines Serums von einem Kranken mit akuter Hepatitis - Ikterus gravis -. Deutlich erkennbare Bilirubinzone im Albuminbereich der Lipoprotein-Elektrophoresestreifen.

Hier handelt es sich um einen Ikterus gravis bei dem 60jährigen Patienten E.O., der mit zwanzig Jahren eine Gasvergiftung erlitten hatte. Im Mai 1956 bemerkte der Patient plötzlich eine Braunfärbung des Urins, Völlegefühl und Obstipation, Schmerzen beiderseits der Lendenwirbelsäule und zunehmende Schwäche. Die Temperatur blieb normal. Kolikartige Schmerzen traten nicht auf. Drei bis vier Wochen später stellte sich zunächst Ikterus der Skleren, dann der Haut ein. Die Leber war zu der Zeit etwas vergrößert, aber nicht druckempfindlich. Im Laufe des folgenden Monats nahm der Ikterus trotz Behandlung zu. Er erreichte schließlich Melasfarbe. Durch Laparoskopie im August 1956 und Laparotomie im Oktober 1956, der sich die histologische Untersuchung von Lebergewebe anschloß, wurde die Diagnose "chronische, diffus ausgebreitete Hepatitis bei beginnendem Lebergewebsumbau" unter Ausschluß anderer Krankheiten gesichert. Das Serum dieses Patienten (Blutentnahme am 12.II.1957) zeigt nach elektrophoretischer Auftrennung in Agargel und in Filterpapier fünf Proteinfractionen. Bei der Agarelektrophorese ist hier die Alpha₁-Globulinfraktion deutlich von der Albuminfraktion getrennt. Ein verminderter Proteingehalt des Serums bei diesem Patienten läßt sich daraus ersehen, daß der Farbstoffgehalt der dargestellten Fractionen wesentlich geringer ist als bei einem Normalserum. Besonders deutlich wird das, wenn man die Größe des Albuminkomplexes des pathologischen Serums mit dem Ausmaß der Albuminfraktion aus einem Normalserum vergleicht.

Durch die Lipidfärbung kann aus diesem Serum in beiden Medien nur eine Fraktion, nämlich die sogenannte Beta-Lipoproteidfraktion dargestellt werden. Im Filterpapier liegt diese Fraktion genau im Bereich des Beta-Globulins, im Agargelstreifen dagegen reicht sie, von der Startstelle aus gesehen, vom Anfang der Alpha₁-Globulinfraktion bis an die Albuminfraktion. Wie bei einem schweren Ikterus zu erwarten ist, zeigt sich der vermehrte Bilirubin-gehalt des Serums an der starken bräunlichen Färbung im Bereich der Albumine.

c) Agargel-Elektrophorese beim Verschlúikterus

Ähnliche Verhältnisse wie beim Ikterus gravis findet man beim Verschlúikterus. Zwei Beispiele sollen das zeigen. Im ersten Fall (dazu Abb. 11) verursachte, wie durch Probepaparatomie festgestellt wurde, ein inoperables, mannsfaustgroßes Pankreaskarzinom den Verschlúikterus.

Die elektrophoretische Auftrennung des Serums und anschließende Anfärbung der Proteine ergibt in beiden Medien fünf Fractionen. Auch bei diesem Serum gelang im Agargel eine deutliche Abtrennung der Alpha₁-Globulinfraktion vom Albumin. Auffallend ist sowohl bei dem Agar- als auch beim Papiarelektrophorese-Streifen, daß eine beträchtliche Menge Substanz aus dem Serum, die sich mit protein- und mit lipidfärbenden Stoffen anfärben läßt, an der Startstelle liegen bleibt. Die Ursache dafür scheint in dem hohen

Glykoproteidgehalt des Serums zu liegen. Die lipidgefärbten Elektrophoresestreifen des Serums weisen ebenso wie die beim Ikterus gravis nur die Beta-Lipoproteidfraction auf. Die Alpha-Lipoproteidfraction, bzw. die Rapidfraction fehlt auch in diesem Fall vollständig. Die schwache Anfärbung der Beta-Lipoproteidfraction im Agarstreifen und die fast nicht sichtbare im Filterpapier ist dadurch zu erklären, daß die größte Lipidmenge bei der Elektrophorese an der Startstelle festgehalten worden ist.

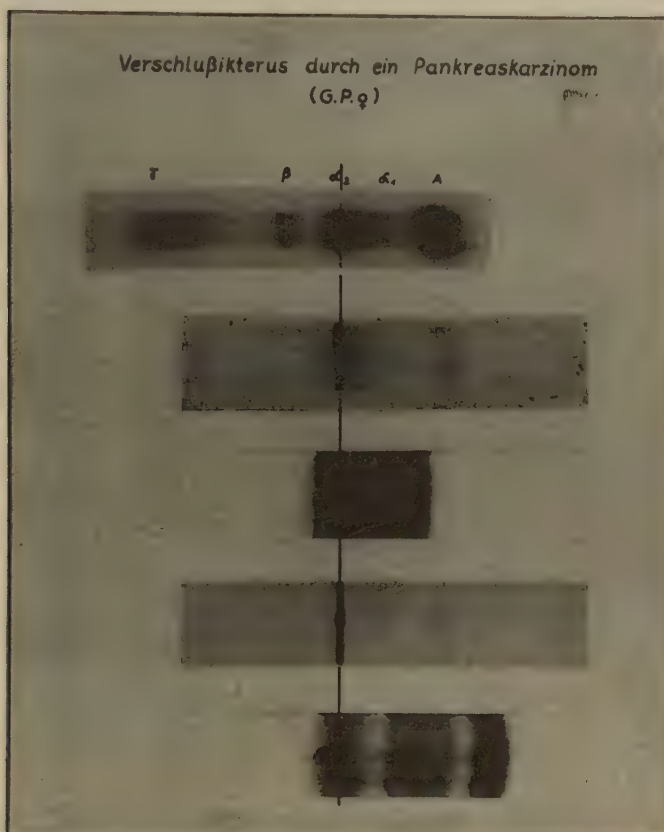


Abb. 11: Elektrophoretische Auftrennung des Serums einer Patientin mit Verschlußikterus durch ein Pankreaskarzinom (Agargelfilme oben, Papierstreifen unten)

Im zweiten Fall ist die Ursache für den Verschlußikterus die Verlegung des Ductus choledochus dicht vor der Papilla Vateri durch ein kirschkerngroßes Konkrement bei einer 65jährigen Patientin (S.H.). Auch hier erscheint nach Elektrophorese und Färbung nur eine Lipoproteidfraktion, und zwar die Beta-Lipoproteidfraktion. Bei der Darstellung in Agargel reicht sie von der Startstelle bis in den Albuminbereich hinein; das zeigt der Vergleich des lipidgefärbten mit dem proteingefärbten Agarfilm, aber auch die bräunliche, durch den erhöhten Bilirubingehalt im Serum bedingte Anfärbung des Albuminkomplexes, die auf dem lipidgefärbten Streifen deutlich zu sehen ist. Im Filterpapierstreifen reicht die dargestellte Fraktion nicht bis in den Albuminkomplex, sondern sie ist deutlich von ihm getrennt. Die Protein-Elektrophoresestreifen beider Medien entsprechen einander, nur ist im Agargel keine scharfe Trennung des Alpha₁-Globulins vom Albumin erfolgt. Im Vergleich zum Normalserum fällt die Vermehrung von Alpha₁- und Alpha₂-Globulin bei diesem Serum auf.

Im Agarfilm ist die Ausdehnung des Albuminkomplexes nicht so groß wie die der Albuminfraktion eines Normalserums im gleichen Medium. Daraus kann auf eine Albuminverminderung im pathologischen Serum geschlossen werden. Gamma-Globulin dagegen ist vermehrt im Serum vorhanden, da sich im Gamma-Bereich eine stärkere Anfärbung als normalerweise findet.

Die Blutentnahme zu diesen Elektrophoreseuntersuchungen wurde vier Tage vor der operativen Beseitigung des Steines aus dem Ductus choledochus gemacht. Der Ikterus bestand zu dem Zeitpunkt vier Wochen.

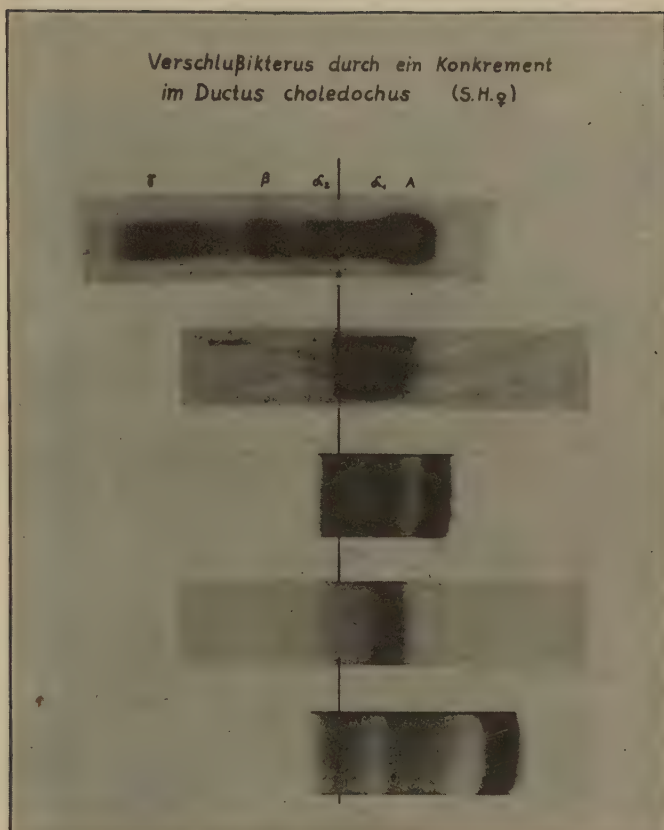


Abb. 12: Elektrophoresen eines Serums bei Verschluß-
ikterus durch ein Konkrement.

d) Agargel-Elektrophorese nach Behebung des Gallengangverschlusses
 Elektrophoreseuntersuchungen mit dem Serum der gleichen Patientin,
 das durch eine Blutentnahme acht Tage nach der Operation gewonnen
 wurde, zeigt die Abb. 13.

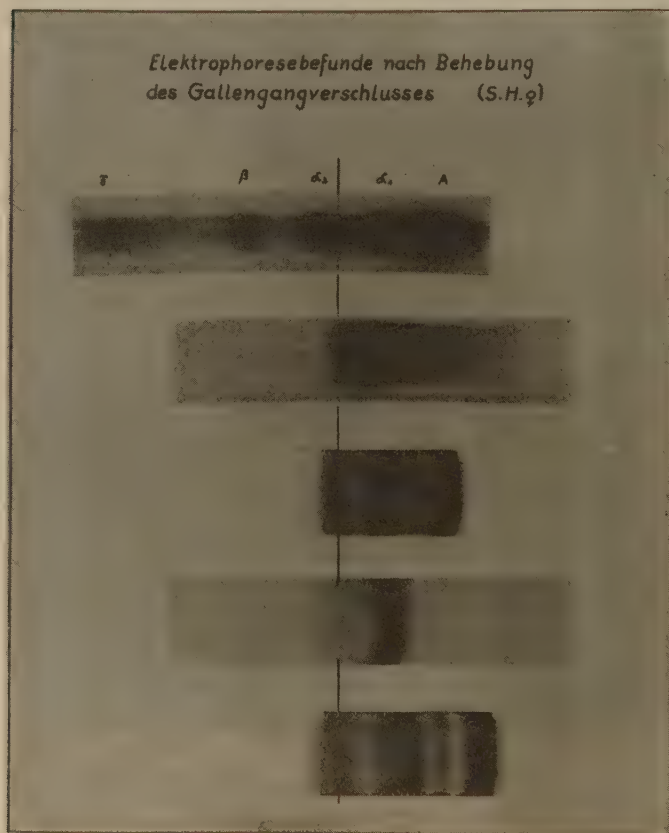


Abb. 13: Veränderungen der Elektrophoresebefunde nach operativer
 Behebung des Gallengangverschlusses.

Im Agarfilm fällt jetzt bei der Darstellung der Proteine eine stärkere Anfärbung der beiden Alpha-Fractionen und des Albumin-komplexes auf, also eine Vermehrung von Alpha₁-Globulin, Alpha₂-Globulin und Albumin. Ein Unterschied zwischen den beiden lipid-gefärbten Papierelektrophorese-Streifen besteht nur darin, daß nach der Operation im Serum die Beta-Lipoproteidfraction sich stärker anfärben läßt und der Albuminbereich weniger durch Bilirubin gefärbt ist als bei der Elektrophoreseuntersuchung des Serums vor der Operation. Dieselben Veränderungen lassen sich auch auf den entsprechenden Agarfilmen erkennen. Die eine bedeutet: der Lipoproteidgehalt im Serum nimmt zu, die andere: der Bilirubinspiegel sinkt, nachdem der Verschluß beseitigt ist.

Neben diesen Veränderungen im Bild der Lipoproteidelektrophorese aber ist eine andere besonders bemerkenswert. Sie zeigt sich nur auf dem Agarstreifen. Während mit der Elektrophoresemethode in Filtrierpapier nur eine Lipoproteidfraction, das Beta-Lipoproteid, abgetrennt und angefärbt werden kann, geschieht bei der Elektrophorese in Agargel eine Auftrennung in drei Fractionen. Die größte Fraction entspricht dem Beta-Lipoproteid. Sie reicht von der Startstelle bis über den Bereich des Alpha₁-Globulins hinaus. Die beiden anderen Lipoproteidfractionen dieses Serums lassen sich nur sehr schwach anfärben. Eine davon liegt im Bereich der Albumine. Die andere ist die Rapidfraction, denn sie liegt anodenwärts vom Albumin.

Eine eindeutige Erklärung dafür, daß die Veränderung im Elektrophoresebild in diesem Fall nur bei der Agarmethode auftritt, kann noch nicht gegeben werden. Vielleicht liegt die Ursache in der Beschaffenheit des Agargels. Durch seinen hohen Flüssigkeitsgehalt hemmt es im Gegensatz zu den Papierfasern kaum den Stofftransport. Möglich ist auch, daß eine so kleine Fraction, die im Agarfilm nur schwach anfärbbar ist, im Filterpapier zwar vorhanden, aber nicht darzustellen ist, denn Filterpapier läßt sich nach der Lipoproteidfärbung in Oelrot nicht so stark entfärben wie der Agarfilm und wie es erforderlich wäre, um eine derart kleine Fraction hervorkommen zu lassen.

Die Wiederkehr der Rapidfraction und der Fraction im Albuminbereich nach Behebung des Gallengangverschlusses zeigt an, daß die Lipoproteidverhältnisse im Serum sich zu normalisieren beginnen.

e) Agargel-Elektrophorese bei chronischer Hepatitis

Elektrophoreseuntersuchungen in Agargel an Seren bei chronischen Hepatitiden und Leberzirrhosen bringen Ergebnisse, die einander weitgehend gleichen. Charakteristische Unterschiede zwischen diesen beiden Erkrankungen der Leber lassen sich aus den Elektrophoresebildern nicht ablesen. Ein Beispiel für das Elektrophoresebild bei chronischen Hepatitiden soll die Abb. 14 geben. Dazu wurde das Serum der 54jährigen W.K. aufgetrennt. Bei der Patientin

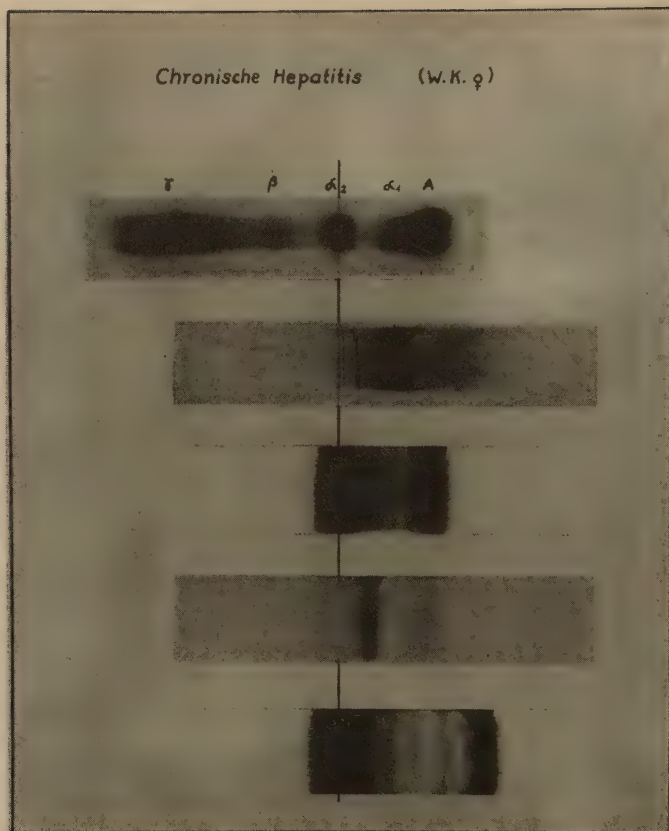


Abb. 14: Elektrophoretische Auftrennungen des Serums von einer Patientin mit chronischer Hepatitis.

war 1951 die Cholecystektomie durchgeführt worden. Die Beschwerden in der Lebergegend blieben danach jedoch bestehen. Während des Krankenhausaufenthaltes im September und Oktober 1956 bestanden Ikterus der Skleren und der Haut und Druckschmerzhaftigkeit der Leber. Der Leberrand war glatt und abgerundet. Bei der Wiederaufnahme in stationäre Behandlung im November 1956 wurde klinisch

eine Leberzirrhose diagnostiziert. Plötzlich aufgetretene Haemorrhoidalblutungen führten schnell zu einer starken Anaemie. Schließlich trat im Januar 1957 der Exitus im Coma hepaticum ein. Bei der Obduktion wurde eine Hyperplasie des rechten und Schrumpfung des linken Leberlappens vorgefunden. Für den linken Leberlappen lautete die Diagnose: Laennec'sche Leberzirrhose. Der Krankheitsverlauf, der Exitus im Coma hepaticum und der Obduktionsbefund am rechten Leberlappen, der eindeutig dystrophische Schübe aufwies, stellten aber das Bild der chronischen malignen Hepatitis in den Vordergrund.

Im proteingefärbten Elektrophoresestreifen erkennt man nach der Auftrennung in Agar gel fünf deutlich voneinander getrennte Fraktionen. Der Albuminkomplex ist im Vergleich zu dem beim Normalserum viel kleiner. Eine wesentlich stärkere Anfärbung im Gamma-Bereich zeigt den sehr hohen Gehalt des Serums an Gamma-Globulin an.

Im lipidgefärbten Agarfilm kann man zwei Fraktionen voneinander abgrenzen. Die Beta-Lipoproteidfraktion reicht von der Alpha₂-Globulinfraktion durch den Alpha₁-Globulinbereich hindurch bis zum Albumin. Deutlich von der Beta-Lipoproteidfraktion getrennt beginnt in der Mitte des Albuminkomplexes die Rapidfraktion. Sie hat ungefähr die gleiche Ausdehnung wie die Beta-Lipoproteidfraktion, ist aber wesentlich schwächer angefärbt. Auch im entsprechenden Filterpapierstreifen ist die stärker angefärbte Fraktion die Beta-Lipoproteidfraktion.

f) Agargel-Elektrophorese bei Leberzirrhose

1. Kompensierte Leberzirrhose

Die Abbildungen 15, 16 und 17 sind Beispiele für Elektrophoreseuntersuchungen bei Leberzirrhosen. In Abb. 15 werden die Elektrophoresebilder eines Serums bei kompensierter Leberzirrhose gezeigt ²¹⁾. Seit 1936 litt die Patientin P.P. häufig an Schmerzen unter dem rechten Rippenbogen und Obstipation. Im November 1936 traten Ikterus und stärkere Schmerzen von ständig gleichmäßiger Intensität unter dem rechten Rippenbogen auf. Der Leberbrand war einen Querfinger breit unter dem Rippenbogen zu tasten. Aszites war nicht nachzuweisen. Die Laparoskopie brachte die Diagnose: Atrophische Leberzirrhose vom Typ Laennec - und ließ einen erhöhten Pfortaderdruck erkennen. Im Agarfilm fällt bei der Darstellung der Proteinfractionen die sehr starke Gamma-Globulinvermehrung auf. Das Alpha₁-Globulin liegt in diesem Fall völlig getrennt von der Albuminfraktion dicht an der Startstelle. Der lipoproteidgefärbte Agarstreifen enthält drei Fraktionen. Die Beta-Lipoproteidfraktion dieses Serums reicht von der Startstelle bis zur Mitte der Strecke zwischen Startstelle und Albuminkomplex. Sie läßt sich, weil der Lipoproteidgehalt des Serums gering ist, nicht so stark anfärben wie die Beta-Lipoproteidfraktion im Normalserum. Viel schwächer

noch als die Beta-Lipoproteidfraktion ist die zweite Lipoproteidfraktion gefärbt. Sie liegt im Bereich des Albumins, hat aber nicht ganz die Ausdehnung wie dieses. Die kleinste der drei dargestellten Fraktionen ist die Rapidfraktion. Sie schließt sich unmittelbar an die Lipoproteidfraktion in der Albuminzone an. Ihre Anfärbung ist so gering, daß man sie nur mit Mühe erkennen kann. Ungefähr hat sie im Agarfilm die Ausdehnung wie die Lipoproteidfraktion im Albuminbereich.

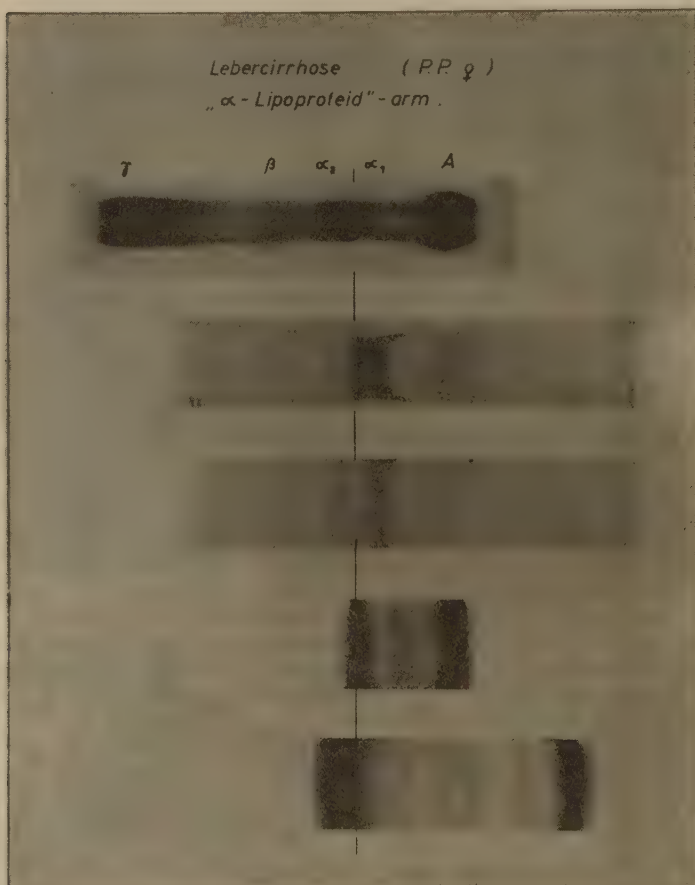


Abb. 15: Elektrophoresen eines Serums bei einer kompensierten Leberzirrhose ("Alpha-Lipoproteid"-armes Serum)

Im entsprechenden Filterpapierstreifen ist nur die Beta-Lipoproteidfraktion zu sehen. Zwischen der Alpha₂- und der Albuminzone könnte man glauben, eine schwache Anfärbung zu erkennen. Da der Alpha-Lipoproteidanteil in diesem Serum, das ohnehin arm an Lipoproteid ist, nur 1 % der gesamten Lipoproteidmenge beträgt, läßt sich die Alpha-Lipoproteidfraktion im Filtrierpapier durch Färbung jedoch nicht ausreichend sichtbar machen.

In beiden Medien also läßt sich in diesem Fall die Rapidfraktion, bzw. das Alpha-Lipoproteid kaum darstellen. Das weist wiederum darauf hin, daß die beiden Fraktionen identisch sind.

2. Agar-Gelelektrophorese bei dekompensierter Leberzirrhose

Zwischen kompensierten und dekompensierten Leberzirrhosen lassen sich wesentliche Unterschiede aus den Elektrophoresebildern nicht ablesen. Bei dekompensierten Leberzirrhosen ist ebenso wie bei den kompensierten Leberzirrhosen und den chronischen Hepatitiden der Albumingehalt des Serums vermindert, der Gamma-Globulingehalt erhöht. Daß die Gamma-Globulinvermehrung bei einer dekompensierten Leberzirrhose nicht stärker sein muß als bei einer kompensierten Leberzirrhose, kann man sehen, wenn man die proteingefärbten Agarfilme der Abbildungen 15 und 16 miteinander vergleicht. Die Abb. 16 zeigt das elektrophoretisch getrennte Serum des 55jährigen L.O. Der Patient leidet seit 1945 an pektanginösen Beschwerden. 1947 wurde bei ihm eine Haemorrhoidenoperation durchgeführt. Im Januar 1956 wurde der Patient in einem Krankenhaus wegen eines Ikterus behandelt. Er mußte seitdem eine eiweißreiche Diät einhalten. Seit 1945 beobachtete der Patient häufige, breiige Stuhlentleerungen. Der Urin war dunkel. Bei der Aufnahme in stationäre Behandlung sicherten die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen die Diagnose einer dekompensierten Leberzirrhose.

Im Agarfilm sind vier Proteinfraktionen deutlich voneinander getrennt dargestellt. Die Alpha₁-Globulinfraktion läßt sich gegen den Albuminkomplex nicht abgrenzen. Der fettgefärbte Agarfilm zeigt eine Auftrennung der Lipoproteide in drei Fraktionen. Obwohl die drei Fraktionen nicht voneinander getrennt sind, kann man sie doch gut durch ihre verschiedenen hohen Farbstoffgehalte gegeneinander abgrenzen. Die Beta-Lipoproteidfraktion beginnt etwas kathodenwärts von der Alpha₁-Globulinfraktion und reicht bis an den Albuminkomplex heran. Dort schließt sich die zweite Fraktion an, die den Albuminbereich einnimmt und noch etwas darüber hinaus reicht. Anodenwärts von dieser Fraktion liegt die Rapidfraktion. Die größte der drei Lipoproteidfraktionen ist die Beta-Lipoproteidfraktion, die kleinste die Rapidfraktion.

Im Papierelektrophoresestreifen lassen sich nur zwei Lipoproteidfraktionen anfärben. Das Beta-Lipoproteid, das auch in diesem Medium die größere Fraktion darstellt, liegt im Bereich des Beta-Globulins, die Alpha-Lipoproteidfraktion in der Albuminzone.

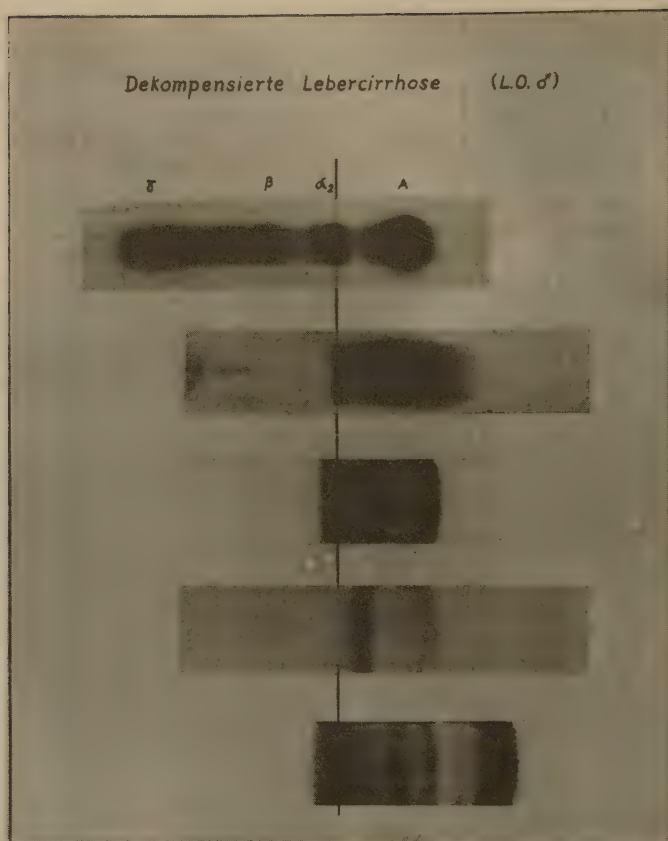


Abb. 16: Elektrophoretische Auftrennungen eines Serums bei dekompensierter Leberzirrhose.

3. Agargel-Elektrophorese bei xanthomatöser biliärer Leberzirrhose

Als drittes Beispiel für die Elektrophoresebilder bei Leberzirrhosen dient die Abb. 17. Sie zeigt die Verhältnisse bei einer xanthomatösen biliären Leberzirrhose. Nach Elektrophorese des Serums der Patientin L.L. lassen sich im Agarfilm fünf Proteinfractionen anfärben. Die Alpha₁-Globulinfraktion nimmt in diesem

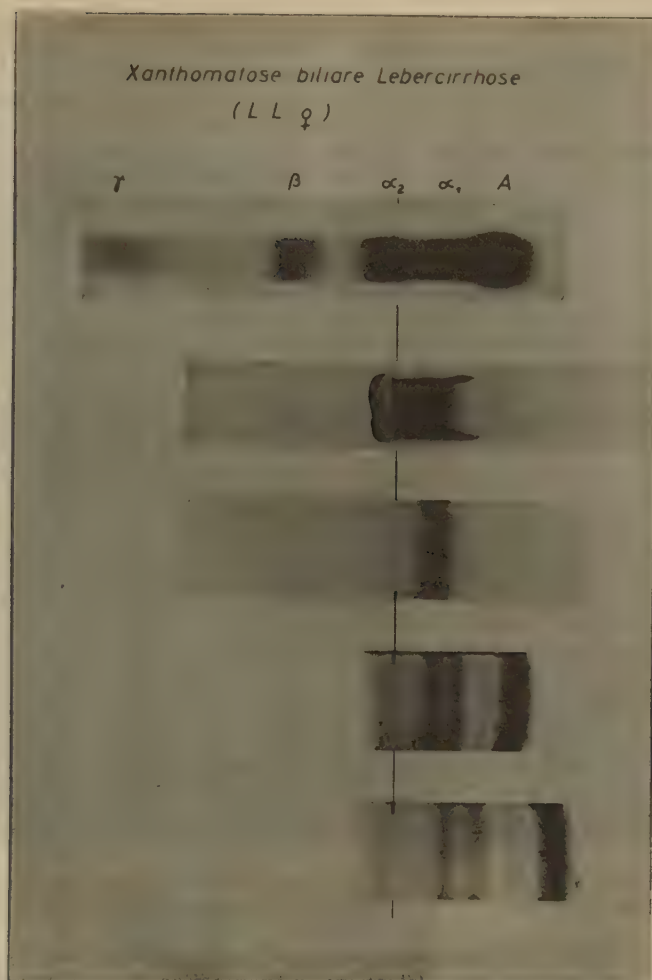


Abb. 17: Elektrophoretische Auftrennungen des Serums einer Patientin mit xanthomatöser biliärer Leberzirrhose

Fall den gesamten Bereich zwischen Startstelle und Albuminfraktion ein. Etwas anodenwärts von der Mitte dieser Zone liegt das Maximum der Anfärbung. Der gegenüber normalen Verhältnissen im

Serum stark erhöhte Anteil von Alpha₁-, Alpha₂- und Beta-Globulin ist bemerkenswert. Die Gamma-Globulinfraktion ist im Vergleich zu der im Normalserum ebenfalls größer, jedoch nicht so groß wie in den Elektrophoresestreifen der abgebildeten Fälle von kompensierter und dekompensierter Leberzirrhose. Durch die Lipoproteidfärbung können im Agarfilm zwei Lipoproteidfraktionen sichtbar gemacht werden, die Beta-Lipoproteidfraktion und die Fraktion im Albuminbereich. Die Beta-Lipoproteidfraktion reicht von der Startstelle bis nahe an den Albuminkomplex und ist kräftig angefärbt. Die zweite Fraktion nimmt den ganzen Albuminbereich ein. Sie hat aber nur wenig Farbstoff angenommen. Die Rapidfraktion fehlt völlig. (Der Farbstreifen kathodenwärts von der Startstelle ist für die Beurteilung des Elektrophoresestreifens ohne Bedeutung, denn er ist durch Überlaufen des Serumgemisches beim Auftragen entstanden).

Der lipoproteidgefärbte Papierelektrophoresestreifen enthält nur die Beta-Lipoproteidfraktion. Es fehlt also in diesem Serum die Fraktion, die im Agarmedium als Rapidfraktion, im Filterpapier als Alpha-Lipoproteidfraktion bezeichnet wird.

g) Agargel-Elektrophorese bei Coma hepaticum

Bisher wurde das Fehlen der Rapidfraktion bzw. der Alpha-Lipoproteidfraktion beim Ikterus gravis, beim Verschlussikterus und bei der xanthomatösen biliären Leberzirrhose beobachtet.

Auch im Coma hepaticum läßt sich aus dem Serum durch elektrophoretische Auftrennung in Agargel keine Rapidfraktion, in Filterpapier keine Alpha-Lipoproteidfraktion darstellen. Die Abb. 18 zeigt das Serum der Patientin G.R. nach Elektrophorese in Agargel. Bei der Patientin war plötzlich ein Hepatitisrezidiv aufgetreten. In kurzer Zeit entwickelte sich ein Ikterus melas, denn dem Rezidiv folgte eine diffuse gelbe Leberatrophie. Bei der Sektion wurde der nahezu völlige Untergang des Lebergewebes festgestellt.

Im mittleren Agarfilm wurde die Lipoproteidfärbung mit Oelrot 0, im unteren Streifen mit Sudanschwarz durchgeführt.

Der proteingefärbte Agarfilm zeigt die Auftrennung des Serums in fünf Proteinfraktionen. Die Alpha₁-Globulinfraktion ist deutlich vom Albumin und von der Alpha₂-Globulinfraktion getrennt. Sie liegt genau in der Mitte zwischen den beiden Fraktionen. In den Parallelstreifen, die mit lipidfärbenden Stoffen angefärbt sind, liegt im Bereich der Alpha₁-Globulinfraktion die Beta-Lipoproteidfraktion. Die Rapidfraktion fehlt vollkommen. Ob sich im Albuminbereich noch eine Fraktion befindet, läßt sich nicht sicher feststellen, weil der Albuminkomplex sehr stark durch Bilirubin gefärbt ist.

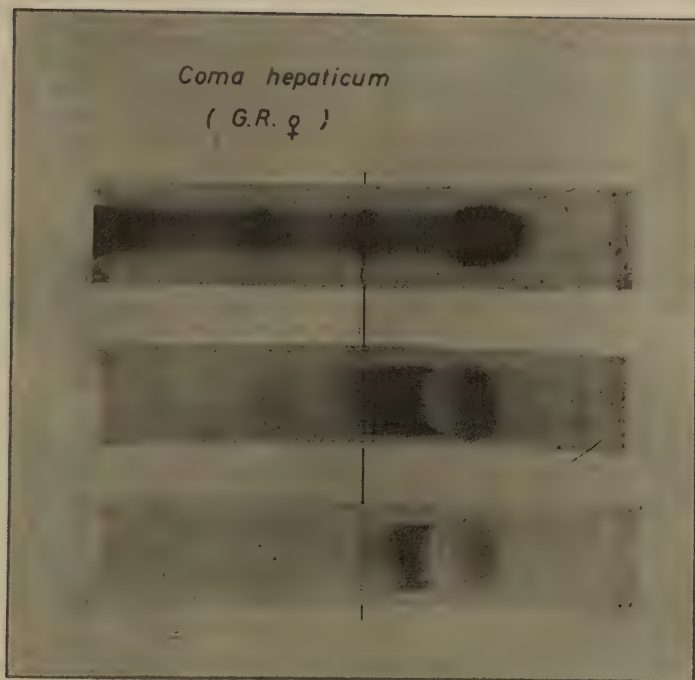


Abb. 18: Elektrophorese in Agargel des Serums einer Patientin im Coma hepaticum.

C. Besprechung der Ergebnisse

I. Grenzen und Wert der Methode

Die Elektrophoresemethode in Agargel ist mit einem wesentlich größeren Zeitaufwand als die Methode in Filterpapier verbunden. Sehr viel Zeit erfordern die Vorarbeiten, besonders das Bereiten und Reinigen des Agargels und das Gießen der Platten. Auch das Trocknen der Agarplatten dauert – bedingt durch den hohen Wassergehalt des Gels – erheblich länger als das Trocknen von Filterpapierstreifen. Die Trenndauer jedoch ist bei Agar- und Papier-elektrophorese annähernd gleich.

Im Gegensatz zu den Papierelektrophoresestreifen sind die Agarfilme nur begrenzt haltbar. Manche Agarfilme bleiben zwar mehrere Jahre unverändert erhalten, andere dagegen werden schon nach einigen Monaten spröde und zerfallen. Die Agarfilme lassen sich am besten an einem kühlen, nicht zu trockenen Ort zwischen Filterpapier aufbewahren. Wegen der begrenzten Haltbarkeit empfiehlt es sich, die Agarfilme rechtzeitig fotometrisch auszuwerten und eventuell zu fotografieren.

Diesen scheinbaren Nachteilen kann aber entgegengesetzt werden, daß in Agargel die einzelnen Fraktionen deutlich voneinander getrennt darstellbar sind. Eine Schwanzbildung wie bei der Papierelektrophorese gibt es bei der Agarelektrophorese nicht, weil vom Gel keine Serumbestandteile zurückgehalten werden wie von den Papierfasern. Die einzelnen Fraktionen sind also rein darstellbar. Das bedeutet einen wesentlichen Vorteil für die Auswertung der Elektrophoresestreifen und spezielle Untersuchung einzelner Fraktionen.

Für besondere Fragestellungen besteht bei der Methode in Agargel die Möglichkeit, nach beendiger Elektrophorese aus dem Gel bestimmte Teile auszuschneiden. Schon in den fixierten, aber noch nicht getrockneten, ungefärbten Platten sind nämlich die einzelnen Fraktionen deutlich sichtbar und voneinander abzugrenzen. Eine durch elektrophoretische Auftrennung gewonnene Fraktion könnte zum Beispiel nach Schmelzen und Verdünnen des Agargels durch Ausfällen, Eluieren oder Zentrifugieren ³⁾ vom Trennmedium befreit werden.

Die Grenzen der Anwendungsmöglichkeit der Agarelektrophorese sind im allgemeinen die gleichen wie bei der Papierelektrophorese. Sie sind nur insofern weiter, als die Darstellung von reinen Fraktionen bessere Voraussetzungen für Auswertung und Weiterverarbeitung bietet.

II. Darstellung der Proteinfractionen und Lipidkomplexe

Für Darstellungen von Proteinfractionen und Lipidkomplexen mit einer neuen Elektrophoresemethode, besonders wenn ein Vergleich mit einer anderen Methode angestrebt wird, eignen sich solche Blutseren, die krankhafte Veränderungen im Elektrophoresebild schon bei bloßer Betrachtung erkennen lassen. Besonders bei Erkrankungen und Miterkrankungen der Leber sind nach elektrophoretischer Auftrennung der betreffenden Seren vielfältige Veränderungen an den Proteinfractionen und Lipidkomplexen feststellbar und deutlich sichtbar.

a) Darstellung der Proteinfractionen

Der Vergleich von Protein-Elektrophoresebildern eines Normalserums, das in Agargel und in Filterpapier aufgetrennt wurde, zeigte die gleiche Anzahl Proteinfractionen bei beiden Methoden (Abb. 2,3). Beim Betrachten der angefärbten Komplexe ließ sich vermuten, daß es sich bei den dargestellten Fractionen in beiden Medien um die gleichen handelt, nämlich um Albumin, Alpha-, Beta- und Gamma-Globulin und zwar in gleicher Reihenfolge. Die Richtigkeit der Vermutung konnte mit den Paralleluntersuchungen von reinen Proteinfractionen und einem Normalserum auf Filterpapier einerseits und in Agargel andererseits bewiesen werden (Abb. 4, 5). Die durch elektrophoretische Auftrennung des Normalserums entstandenen Proteinfractionen sind tatsächlich Albumin, das am weitesten anodenwärts von der Startstelle liegt, Alpha₁-Globulin, ebenfalls anodenwärts von der Startstelle, Alpha₂-Globulin, an der Startstelle bzw. nur wenig kathodenwärts neben der Startstelle, Beta-Globulin, kathodenwärts vom Alpha₂-Globulin, und Gamma-Globulin, weit kathodenwärts. Bei der Verwendung des angegebenen Veronalpuffers mit einem pH-Wert von 8,2 wäre eigentlich zu erwarten gewesen, daß alle Fractionen im Agargel in Richtung zur Anode wandern. Die Wanderung der Beta- und Gamma-Globuline zur Kathode, also gegen die Stromrichtung, läßt sich durch die Einwirkung der Elektroendosmose erklären.

Im Agargel sind die Proteinfractionen deutlich voneinander getrennt. Zwischen den Fractionen befinden sich völlig proteinfreie Zonen, wie die Auswertung der Agarfilme mit dem Zeiss-Photometer bewies. Die bei der Papierelektrophorese störende Schwanzbildung ist also nicht vorhanden. Eine scheinbare Schwanzbildung auf manchen Agarfilmen hinter dem Albumin beruht auf der in diesen Fällen ungenügenden Abtrennung des Albumins vom Alpha₁-Globulin.

Errechnet man aus dem Farbstoffgehalt eines Papierelektrophoresestreifens und aus dem eines Agarfilms nach Auftrennung des gleichen Serums die prozentuale Verteilung der Proteine, so erhält man nicht völlig gleiche Werte. Der Albumin- und der Gamma-Globulinwert sind bei der Agarelektrophoresemethode höher als bei der Papier-

elektrophoresemethode, der Alpha- und der Beta-Globulinwert niedriger. Diese Differenzen lassen sich aus der im Agargel nicht auftretenden Schwanzbildung erklären. Durch Adsorption eines gewissen Teils von Protein an die Papierfasern muß sich zwangsläufig bei der Papierelektrophoresemethode der Wert für die Alpha- und Beta-Globuline erhöhen. Bei der Agarelektrophorese hingegen erhält man die genauen Werte für den prozentualen Anteil der einzelnen Fraktionen. Ein Beispiel für diese Verhältnisse zeigt die Tabelle 1.

Agarelektrophoresebilder von Seren Leberkranker enthalten immer die gleichen fünf Fraktionen wie die von Normalseren. Wie bei der Papierelektrophorese werden die krankhaften Veränderungen an der Änderung der prozentualen Verteilung der Proteine, d.h. an der Änderung des Proteingehaltes der einzelnen Fraktionen erkennbar. Als Beispiele für besonders starke Vermehrung der Gamma-Globuline und Verminderung der Albumine seien die abgebildeten Agarfilme von Leberzirrhosen (Abb. 15, 16) und der chronischen Hepatitis (Abb. 14) genannt. Deutlich ist die Änderung der prozentualen Verteilung der Serumproteine auch auf dem Agarelektrophoresebild der akuten Hepatitis (Abb. 8) zu sehen. Hier fällt neben einer Verminderung der Albumine und Vermehrung der Gamma-Globuline der hohe Gehalt an Beta-Globulin auf. Die Zunahme des Proteingehaltes einer Fraktion ist bei der Darstellung in Agargel durch intensivere Anfärbung des Komplexes und eine flächenmäßige Ausdehnung dieser Fraktion erkennbar. Die meisten Veränderungen der Proteinverteilung lassen sich schon bei augenscheinlicher Betrachtung der Agarfilme feststellen. Bei den Papierelektrophoresestreifen hingegen ist das nicht so leicht möglich, weil erstens die Fraktionen viel dichter beieinander liegen und zweitens trotz gleicher Färbemethode die Filterpapierstreifen einmal stärker, einmal schwächer entfärbt sind. Ein Vergleich der beiden proteingefärbten Agarfilme in den Abb. 12 und 13 miteinander und den beiden entsprechenden Papierelektrophoresestreifen zeigt den Vorteil der Agarelektrophorese.

b) Darstellung der Lipidkomplexe

Nachdem es sich gezeigt hatte, daß bei der Proteinelektrophorese in Agargel die gleichen Fraktionen in gleicher Reihenfolge und gleicher prozentualen Verteilung wie in Filterpapier darstellbar sind, waren entsprechende Übereinstimmungen bei der Darstellung von Lipidkomplexen durch Agargel- und Papierelektrophorese zu erwarten.

Im allgemeinen enthält der Agarfilm nach Auftrennung von Normalseren zwei Lipidkomplexe; einer liegt zwischen Startstelle und Albuminkomplex, der andere anodenwärts vom Albumin. In manchen Fällen findet sich jedoch noch ein Komplex im Bereich der Albumine. Dieser dritte Komplex tritt sowohl in Normalseren als auch in Seren Kranker auf und ist nicht auf Ungenauigkeiten in der Methode

in Agargel zurückzuführen; ist er in einem Serum vorhanden, so läßt er sich bei Kontrolluntersuchungen des gleichen Serums reproduzieren. Er muß streng von einer bräunlichen Anfärbung des Albuminbereichs unterschieden werden, die nach Auftrennung von Seren mit hohem Bilirubingehalt auftritt.

Die Lipidkomplexe im Agarfilm sind nicht immer deutlich voneinander abgetrennt wie die Proteinfractionen, aber immer deutlich gegeneinander abzugrenzen, weil sich die Farbtintensität von Komplex zu Komplex nicht allmählich, sondern ohne Übergang ändert.

Während der Elektrophorese in Agargel wandern die drei Lipidfraktionen sämtlich anodenwärts. Im Bereich des Beta-Globulins, das wie beschrieben kathodenwärts von der Startstelle liegt, befindet sich kein Lipidkomplex. Die beiden Hauptkomplexe lassen sich also nicht ohne weiteres dem Alpha- und dem Beta-Globulin zuordnen, wie es bisher bei der Papierelektrophorese getan wurde. Sie wurden in dieser Arbeit als Rapidfraktion und Beta-Lipoproteidfraktion bezeichnet. Die Benennung "Rapidfraktion" wurde von GRABAR ⁹⁾ übernommen.

Die bei der Papierelektrophorese anscheinend feste Bindung von Alpha-Lipoproteid an das Alpha₁-Globulin und die von Beta-Lipoproteid an das Beta-Globulin besteht bei der Methode in Agargel nicht. Ob nun im Verlauf der Agarelektrophorese bestehende Bindungsverhältnisse gelöst werden, oder ob die angenommenen Bindungsverhältnisse, die sich bei der Papierelektrophorese zeigen, möglicherweise gar nicht bestehen, müßten besondere Untersuchungen klären.

Um die Bestätigung zu finden, daß die beiden Hauptlipidkomplexe in der Agarelektrophorese die gleichen wie bei der Papierelektrophorese sind, wurden zunächst Versuche mit Lipidfraktionen, die durch Ultrazentrifugierung gewonnen wurden ¹⁾, in Filterpapier und Agargel durchgeführt. Dazu wurde eine gleichzeitige Elektrophorese eines Normalserums, eines Ultrazentrifugates, das nur die Beta-Lipoproteidfraktion, und eines Ultrazentrifugates, das die Alpha- und die Beta-Lipoproteidfraktion enthielt, einmal in Filterpapier und einmal in Agargel durchgeführt. Vom Normalserum wurden bei beiden Methoden zwei Elektrophoresestreifen angefertigt, je einer wurde protein- je einer fettgefärbt.

Im Filterpapier lag nach der Elektrophorese das Beta-Lipoproteid beider Ultrazentrifugate etwas anodenwärts vom Beta-Globulin und Beta-Lipoproteid des Normalserums, das Alpha-Lipoproteid des beide Lipoproteidfraktionen enthaltenden Ultrazentrifugates im Bereich vom Albumin und etwas anodenwärts vom Alpha-Lipoproteid des Normalserums.

¹⁾ Für die freundliche Überlassung der Ultrazentrifugate danke ich Herrn Professor Dr. med. F. A. P e z o l d .

In den Agarstreifen lag nach der Elektrophorese das Beta-Lipoprotein beider Ultrazentrifugate im Bereich zwischen Startstelle und Albuminkomplex des Normalserums; im annähernd gleichen Bereich fand sich auf dem fettgefärbten Agarfilm mit Normalserum der eine der beiden dargestellten Lipidkomplexe. Anodenwärts vom Albuminkomplex des Normalserums lagen sowohl der zweite Lipidkomplex des Normalserums, die Rapidfraktion, als auch das Alpha-Lipoprotein des Ultrazentrifugates.

Als Ergebnis dieser Untersuchung läßt sich feststellen: Das Beta-Lipoprotein aus den Ultrazentrifugaten entspricht dem sogenannten Beta-Lipidkomplex bei der Agarelektrophorese und dem Beta-Lipoprotein bei der Papiarelektrophorese. Folglich ist der Beta-Lipidkomplex bei der Methode in Agargel mit der Beta-Lipoproteinfraktion bei der Papiermethode gleichartig. In gleicher Weise wird durch die beschriebene Untersuchung deutlich, daß es sich bei der Rapidfraktion in der Agarmethode und der Alpha-Lipoproteinfraktion in der Papiarelektrophorese um die gleiche Lipidfraktion handelt ^{19,21}).

Die Übereinstimmung der beiden Hauptlipidkomplexe in der Agarelektrophorese mit denen der Papiarelektrophorese wird außerdem bei Betrachtung der Elektrophoresebilder von Seren Leberkranker erkennbar. Wenn sich durch Papier-Elektrophorese einiger dieser Seren nur die Beta-Lipoproteinfraktion darstellen läßt, die Alpha-Lipoproteinfraktion also fehlt, zum Beispiel beim Ikterus gravis (Abb. 10), beim Verschlußikterus (Abb. 11, 12), beim Coma hepaticum (Abb. 18), so fehlt auf den entsprechenden Agarelektrophoresebildern immer die sogenannte Rapidfraktion, also der Lipidkomplex, der sonst anodenwärts vom Albumin zu finden ist.

In einigen Fällen, zum Beispiel nach Elektrophorese eines Serums bei xanthomatöser biliärer Leberzirrhose (Abb. 17), bei denen im Filterpapier die Alpha-Lipoproteinfraktion, im Agarfilm die Rapidfraktion fehlte, stellten sich im Agarfilm zwei Fraktionen dar, nämlich der sogenannte Beta-Lipidkomplex im Bereich zwischen Startstelle und Albuminfraktion und ein Komplex im Albuminbereich.

Nach diesen Beobachtungen kann angenommen werden, daß die durch Papiarelektrophorese darstellbare Beta-Lipoproteinfraktion bei der Agarelektrophorese zuweilen in zwei Komplexen auftritt. In den Seren, die bei der Papiarelektrophorese beide Lipoproteinfraktionen aufweisen, bei der Agarelektrophorese jedoch drei (Abb. 16), würden demnach im Agarfilm der Komplex zwischen Startstelle und Albuminbereich zusammen mit dem im Albuminbereich der Beta-Lipoproteinfraktion im Papierstreifen, die Rapidfraktion der Alpha-Lipoproteinfraktion entsprechen.

Die Untersuchung der Lipidkomplexe in den Agarfilmen hinsichtlich ihrer flächenmäßigen Ausdehnung zeigt, besonders nach Auftrennung

von Seren Leberkranker, zum Teil deutliche Unterschiede. Vor allem fallen sie beim Vergleichen verschiedener Beta-Lipidkomplexe auf. In den meisten abgebildeten Agarfilmen hat der Beta-Lipidkomplex eine Ausdehnung von der Startstelle bis an oder in den Albuminkomplex (z.B. Abb. 9, 12, 17). In anderen Fällen beginnt der Beta-Lipidkomplex erst im Bereich von Alpha₂- oder Alpha₁-Globulin. Die anodenwärts gelegene Grenze der Beta-Lipidkomplexe liegt im Bereich zwischen Alpha₁-Globulin und der Mitte vom Albuminkomplex. Die Verschiedenartigkeit der Ausdehnung, bzw. Wanderungstrecke der Beta-Lipidfraktion hat ihre Ursache wahrscheinlich in der Zusammensetzung des Beta-Lipids der einzelnen Seren. Der quantitative Gehalt eines Serums an Lipiden dagegen wird an der Farbintensität der einzelnen Lipidkomplexe deutlich.

D. Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wird die Methodik der Agargel-Elektrophorese behandelt. Die Pionierarbeit von GRABAR und seinen Mitarbeitern diente als Grundlage für das hier angewandte Verfahren.

Die Elektrophorese wird in einem 2%igen Agargel bei konstanter Klemmenspannung und einer Spannung von 4,5 V/cm im Trennmedium durchgeführt. Als Pufferlösung wird ein 0,05 mol Veronalpuffer mit einem pH -Wert von 8,2 verwendet. Die Dauer des Trennvorganges beträgt sieben Stunden. Während dieser Zeit verhindert ein Pufferdurchlauf von ca. 1,5 l pro Stunde pH -Änderungen des Puffers in den Wannen.

Zur Fixation der gewanderten Komponenten dient 2%ige Essigsäurelösung.

Die Färbung erfolgt nach beendeter Trocknung der Elektrophoreseplatten. Zur Darstellung der Proteinfractionen wird mit Amidoschwarz-Lösung, zur Darstellung der Lipoproteid-Komplexe mit Oelrot O-Lösung gefärbt.

Der zweite Teil der Arbeit enthält die Berichte über Darstellungen von Protein- und Lipoproteidfractionen, zunächst aus Normalseren und mit reinen Proteinfractionen, schließlich aus Seren von Leberkranken.

Aus Vergleichsgründen stehen den Elektrophoresen in Agargel die Auftrennungen der gleichen Seren in Filterpapier gegenüber.

Menschliches Normalserum wird bei Anwendung dieser Elektrophoresemethode in Agargel mindestens in vier, meist in fünf Proteinfractionen aufgetrennt. Zwischen den Komplexen liegen völlig proteinfreie Zonen.

Vergleichende elektrophoretische Auftrennungen von chemisch reinen Proteinfractionen mit einem Normalserum einerseits in Agargel, andererseits in Filterpapier zeigen, daß sich mit beiden Elektrophoresemethoden die gleichen Proteinfractionen in gleicher Reihenfolge darstellen lassen. Während im Filterpapier alle Fractionen anodenvärts wandern, werden im Agargel die Beta- und die Gamma-Globulinfraction durch Einwirkung der Elektroendosmose kathodenvärts getragen. In der prozentualen Verteilung der Komponenten lassen sich beim Vergleich zwischen Agargel- und Papier-Elektrophoresemethode keine grundsätzlichen Unterschiede feststellen. Die etwas höheren Werte bei der Agargelmethode für Albumin und Gamma-Globulin und die entsprechend niedrigeren für Alpha- und Beta-Globulin lassen sich durch die im Agargel nicht auftretende Schwanzbildung erklären. Die angewandte Methode ist absolut einwandfrei reproduzierbar.

Bei Elektrophorese-Untersuchungen von Seren Leberkranker in Agargel erscheinen die gleichen Proteinfractionen wie im Normalserum. Unterschiede im Vergleich zur Papier-Elektrophorese sind nicht festzustellen; alle pathologischen Veränderungen zeigen sich gleichermaßen in beiden Medien, sind aber im Agargel deutlicher sichtbar.

Durch die Lipidfärbung lassen sich nach elektrophoretischer Auftrennung in Agargel im allgemeinen zwei, häufig aber drei Lipidfraktionen darstellen, die alle anodenwärts von der Startstelle liegen und nicht wie bei der Papier-Elektrophorese Proteinfractionen zuzuordnen sind. Niemals ist bei der Methode in Agargel ein Lipidkomplex im Beta-Globulinbereich vorhanden. Versuche mit in der Ultrazentrifuge gewonnenen Alpha- und Beta-Lipoproteidfraktionen und die elektrophoretischen Untersuchungen der Seren Leberkranker sagen aus, daß es sich trotz der Unterschiede in dem Verhalten der Lipide in den beiden Trennmedien doch um die gleichen Lipidfraktionen handelt.

Von der nach Agargel-Elektrophorese öfter im Albuminbereich zu beobachtenden dritten Fraktion ist infolge der vorgenommenen Untersuchungen die Zugehörigkeit zum Beta-Lipoproteid anzunehmen.

Aufgrund der beschriebenen Vorteile der Agargelmethode können Veränderungen an den Lipoproteiden im Verlauf von Leberkrankheiten frühzeitiger als mit der Papier-Elektrophoresemethode erkannt werden.

L i t e r a t u r

1. BOCKEMÜLLER, W. und A. OERTER:
Zonenelektrophorese in Agar-Gel.
Sd. aus den Arb. aus dem Paul-Ehrlich-Inst., dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Inst., Frankfurt, 52, 61 (1956)
2. BURTIN, P., L. HARTMANN, R. FAUVERT et P. GRABAR:
Études sur les protéines du myélome.
I. Étude critique des techniques d'identification de la protéine de Bence-Jones et de leur valeur diagnostique.
Rev. Française d'Études Clin. et Biol. 1, 17 (1956)
3. BUSSARD, A. and D. PERRIN:
Electrophoresis in agar plates.
J. Labor. a. Clin. Med. 46, 689 (1955)
4. FIELD, C.W. and O. TEAGUE:
The electrical charge of toxin and antitoxin.
J. Exper. Med. 8, 86 (1907)
5. FIELD, C.W. and O. TEAGUE:
On the electrical charge of the native proteins and the agglutinins.
J. Exper. Med. 9, 222 (1907)
6. GORDON, A.H., B. KEIL, K. ŠEBESTA, O. KNESSL and F. ŠORM:
Electrophoresis of proteins in agar jelly.
Coll. Českoslov. chem. Commun. 15, 1 (1950)
7. GORDON, R.S.:
Interaction between oleate and the lipoproteins of human serum.
J. Clin. Invest. 34, 477 (1955)
8. GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10, 193 (1953)
9. GRABAR, P.:
Étude sur les protéines à l'aide de méthodes immunochimiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 65 (1954)
10. GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS jr.:
Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Biochim. Biophys. Acta 17, 67 (1955)
11. GRABAR, P.:
Étude immunologique des gamma-globulines et la médecine des enfants.
Centre International de l'Enfance, Travaux et Documents IX (1955)

12. GRABAR, P.:
L'analyse immuno-électrophorétique de mélanges de protéines.
Extrait des Actes du Colloque sur la Diffusion, Montpellier
1955, 1973.
Publications Scientifiques et Techniques du Ministère de
l'Air, N° N.T. 59
13. GRABAR, P.:
Étude de mélanges de protéines par analyse électrophorétique
et immuno-électrophorétique en milieu gélifié.
Proc. III. Intern. Congr. Biochem. Bruxelles 1955.
New York: Academic Press Inc. Publishers 1956
14. GRABAR, P., R. FAUVERT, P. BURTIN, L. HARTMANN:
Études sur les protéines du myélome.
II. L'Analyse immuno-électrophorétique des sérums de 30
malades.
Rev. Française d'Études Clin. et Biol. 1, 175 (1956)
15. JENCKS, W.P., M.R. JETTON and E.L. DURRUM:
Paper electrophoresis as a quantitative method.
Biochem. J. 60, 205 (1955)
16. KESSEL, M.:
Elektrophoretische Trennung löslicher Organeiwesise auf
Agar-Gel.
Naturwissenschaften 45, 365 (1958)
17. KESSEL, M.:
Darstellung und Identifizierung elektrophoretisch trennbarer
Organproteine auf Agar-Gel.
Clin. Chim. Acta 4, 142 (1959)
18. PEZOLD, F.A., K. OEFF u. M. KESSEL:
Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Färbemethoden
auf die Auswertungsergebnisse der Papierelektrophorese unter
Verwendung von radioaktiv markierten Proteinfractionen.
Sd. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, S. 89-96 (1959)
19. PEZOLD, F.A.:
Zur Kenntnis der elektrophoretisch trennbaren Lipoproteid-
fractionen im Blutserum.
Klin. Wschr. 35, 475 (1957)
20. PEZOLD, F.A. und H. THOMAS:
Elektrophoretische Untersuchungen von Humanseren und isolier-
ten Proteinfractionen mittels einer standardisierten Agar-
Technik.
Z. ges. exp. Med. 129, 412 (1957)

21. PEZOLD, F.A.:
Vergleichende Untersuchungen der Lipoproteine in Humanseren
und Ultrazentrifugaten mittels der Zonen-Elektrophorese in
Filterpapier und Agar-Gel.
Clin. Chim. Acta 3, 40 (1958)
22. RESSLER, N. and B. ZAK:
Electrophoresis in a fluid film.
Clin. Chim. Acta 1, 301 (1956)
23. SCHEIDEGGER, J.J.:
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)
24. TEAGUE, O. and B.H. BUXTON:
Electric charges carried by the hemolysins.
J. Exper. Med. 9, 254 (1907)
25. URIEL, J., et J.J. SCHEIDEGGER:
Électrophorèse en gélose et coloration des constituants.
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 37, 165 (1955)
26. URIEL, J. et P. GRABAR:
Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et
immuno-électrophorétique en milieu gélifié.
Ann. Inst. Pasteur 90, 427 (1956)
27. URIEL, J. et P. GRABAR:
Étude des lipoprotéines sériques par l'électrophorèse en
gélose et l'analyse immuno-électrophorétique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 1253 (1956)
28. URIEL, J., P. GRABAR et CH. WUNDERLY:
Étude d'un sérum de macro-globulinémie par l'électrophorèse
en gélose et sur papier et par ultracentrifugation.
Clin. Chim. Acta 2, 35 (1957)
29. URIEL, J.:
Étude de l'activité enzymatique de la céruloplasmine du sérum
humain après électrophorèse et immuno-électrophorèse en
gélose.
Bull. Soc. Chim. Biol. 39, 105 (1957)
30. URIEL, J.:
Les réactions de caractérisation des constituants des liquides
biologiques après électrophorèse en gélose.
Clin. Chim. Acta 3, 17 (1958)

31. URIEL, J.:
Interprétation qualitative des résultats après électrophorèse en gélose. I. Considérations générales. Application à l'étude de constituants protéiques isolés.
Clin. Chim. Acta 3, 234 (1958)
32. URIEL, J.:
Interprétation quantitative des résultats après électrophorèse en gélose. II. Les protéines et les lipoprotéines du sérum humain normal.
Clin. Chim. Acta 3, 384 (1958)
33. WIEME, R.J. and M. RABAEY:
A new technique of quantitative ultramicroelectrophoresis.
Naturwissenschaften 44, 112 (1957)
34. WIEME, R.J.:
An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slides.
Clin. Chim. Acta 4, 317 (1959)
35. WIEME, R.J.:
Studies on agar-gel electrophoresis. Techniques - Applications.
Arscia Uitgaven N.V., Brüssel (1959)
36. WILLIAMS, C.A. jr. and P. GRABAR:
Immunoelectrophoretic studies on serum proteins.
J. of Immunology 74, 158, 397, 404 (1955)

N a c h w o r t

Für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller Hilfsmittel im Eiweißlaboratorium und besonders den jederzeit hilfreich gegebenen Rat bin ich Herrn Professor Dr. med. F.A. PEZOLD zu großem Dank verpflichtet.

Eine kurze Beschreibung der Methodik der Agargel-Elektrophorese und ihrer Anwendungsmöglichkeiten wurde mit Genehmigung des Dekans der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. F. von MIKULICZ-RADECKI, und des Direktors der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin, Herrn Professor Dr. Dr.h.c. Dr.h.c. Dr.h.c. H. Frhr. von KRESS, 1957 gemeinsam mit Herrn Professor Dr.med. F.A. PEZOLD in der Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, Bd. 129, S. 412-422 unter dem Titel "Elektrophoretische Untersuchungen von Humanseren und isolierten Proteinfractionen mittels einer standardisierten Agar-Technik" veröffentlicht.

Lebenslauf

Am 4. Januar 1933 wurde ich, Helga Manfras geb. Thomas, in Berlin geboren. Meine Eltern sind der Lehrer Silvester Thomas und Hildegard Thomas geb. Prinz.

Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Volksschule in Berlin-Charlottenburg, anschließend bis Februar 1945 die Städtische Oberschule für Mädchen in Guben/Niederlausitz. Ab Juni 1945 war ich Schülerin der Sophie-Charlotte-Schule in Berlin-Charlottenburg und bestand dort am 11. Juni 1951 die Reifeprüfung.

Zum Wintersemester 1952/53 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Mein Studium führte ich ohne Unterbrechung an der Freien Universität Berlin durch und bestand nach fünf vorklinischen und sieben klinischen Semestern die ärztliche Prüfung am 11. Februar 1959.

Die Ausbildung als Medizinalassistentin erhielt ich im St.Gertrauden-Krankenhaus in Berlin-Wilmersdorf, nach meiner Heirat im November 1960 im Friederikenstift in Hannover. Zur Zeit bin ich als Medizinalassistentin im DRK-Cecilienstift, einem Kinderkrankenhaus in Hannover, und beende dort die Ausbildungszeit Ende Juli 1961.

Druck: Druckerei der Tierärztlichen Hochschule Hannover